

(51) 国際特許分類7 C12Q 1/61, 1/60, 1/48, 1/44, 1/32, 1/26, G01N 33/92		A1	(11) 国際公開番号 WO00/60112
			(43) 国際公開日 2000年10月12日(12.10.00)
(21) 国際出願番号 PCT/JP00/02114		(81) 指定国 JP, US	
(22) 国際出願日 2000年3月31日(31.03.00)		添付公開書類 国際調査報告書	
(30) 優先権データ 特願平11/128994 1999年4月1日(01.04.99) JP 特願平PCT/JP99/06723 1999年12月1日(01.12.99) JP			
(71) 出願人 ; および (72) 発明者 岡田正彦(OKADA, Masahiko) 〒951-8131 新潟県新潟市白山浦一丁目315番地 Niigata, (JP) (74) 代理人 平木祐輔, 外(HIRAKI, Yusuke et al.) 〒105-0001 東京都港区虎ノ門一丁目17番1号 虎ノ門5森ビル3階 Tokyo, (JP)			
(54)Title: METHOD FOR QUANTITATING VERY LOW-DENSITY LIPOPROTEIN AND INTERMEDIATE DENSITY LIPOPROTEIN TRIGLYCERIDES			
(54)発明の名称 超低比重リポ蛋白及び中間比重リポ蛋白のトリグリセライド定量方法			
(57) Abstract A method for selectively quantitating triglycerides contained in very low-density lipoproteins and/or intermediate density lipoproteins which comprises treating a sample with an enzyme catalyzing a series of reactions leading to the formation of hydrogen peroxide or a reductive coenzyme from triglycerides in the presence of a selective reaction promoter, and measuring the hydrogen peroxide or reductive coenzyme thus formed; and a reagent for selectively quantitating triglycerides contained in very low-density lipoproteins and/or intermediate density lipoproteins in a sample which contains: (i) a selective reaction promoter; and (ii) an enzyme catalyzing a series of reactions leading to the formation of hydrogen peroxide or reductive coenzyme from triglycerides.			

BEST AVAILABLE COPY

(57)要約

本発明は、被検試料に、選択的反応促進物質の存在下、トリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒する酵素を作用させ、生成する過酸化水素又は還元型補酵素の測定を行う、超低比重リポ蛋白及び／又は中間比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライドを選択的に定量する方法；並びに (i) 選択的反応促進物質、及び (ii) トリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒する酵素を含有する、試料中の超低比重リポ蛋白及び／又は中間比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライドを選択的に定量するための試薬に関する。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AG	アンティグア・バーブーダ	DZ	アルジェリア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AL	アルバニア	EE	エストニア	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LK	スリ・ランカ	SG	シンガポール
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AU	オーストラリア	FR	フランス	LS	レソト	SK	スロヴァキア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LU	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BE	ベルギー	GE	グルジア	MA	モロッコ	TD	チャード
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MC	モナコ	TG	トーゴ
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BJ	ベナン	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BR	ブラジル	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TR	トルコ
BS	バハマ	GW	ギニア・ビサウ		共和国	TT	トリニダード・トバゴ
CA	カナダ	HR	クロアチア	ML	マリ	UZ	ウズベキスタン
CC	中央アフリカ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	UZ	ウズベキスタン
CD	コンゴ	ID	インドネシア	MR	モリタニア	VN	ヴェトナム
CH	スイス	IE	アイルランド	MW	マラウイ	YU	ユーゴスラヴィア
CI	コートジボワール	IL	イスラエル	MX	メキシコ	ZA	南アフリカ共和国
CM	カメルーン	IN	インド	MZ	モザンビーク	ZW	ジンバブエ
CN	中国	IT	イタリア	NE	ニジェール		
CU	キューバ	JP	日本	NL	オランダ		
CY	キプロス	KE	ケニア	NO	ノルウェー		
CZ	チェコ	KG	キルギスタン	NZ	ニュージーランド		
DE	ドイツ	KP	北朝鮮	PL	ポーランド		
DK	デンマーク	KR	韓国	PT	ポルトガル		
				RO	ルーマニア		

明 細 書

超低比重リポ蛋白及び中間比重リポ蛋白のトリグリセライド定量方法

技術分野

本発明は、動脈硬化症の臨床診断に重要な超低比重リポ蛋白及び／又は中間比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライドの選択的定量方法及び選択的定量試薬に関する。

背景技術

コレステロールやトリグリセライドは生体にとって必須の栄養素である。これらは、水に溶解難いため、両親媒性の膜に包まれて（リポ蛋白として）血液中に存在している。

リポ蛋白には、カイロミクロン、超低比重リポ蛋白（Very Low Density Lipoprotein; VLDL）、中間比重リポ蛋白（Intermediate Density Lipoprotein; IDL）、低比重リポ蛋白（Low Density Lipoprotein; LDL）、高比重リポ蛋白（High Density Lipoprotein; HDL）などの種類があり、複雑な代謝系を形成している。

各リポ蛋白ともコレステロールとトリグリセライドを含有しているが、VLDLとIDLに関してはトリグリセライドが主成分であり、かつ動脈硬化症の発生に深く関わっている。したがって、VLDLとIDLのトリグリセライドを分別定量することは有用である。

動脈硬化症の発生に関与する諸要因を調べたいいくつかの大規模追跡調査によれば、LDLコレステロールと、血清中トリグリセライドの総量（以下、総トリグリセライドと呼ぶ）は促進的に、またHDLコレステロールは抑制的に作用することが証明されている。

トリグリセライドはLDLとHDLにはほとんどなく、大部分がカイロミクロ

ン、VLDL及びIDLに含まれている。

一方、カイロミクロン中のトリグリセライドは動脈硬化症の危険因子ではないことが示されている。

したがって、カイロミクロンだけを排除し、他のリポ蛋白中のトリグリセライドを定量しても一応の目的は達せられる。

各種リポ蛋白を分別せずに総トリグリセライドを定量する方法はすでに存在し、広く使われている (Henry, J. B., Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Method, Philadelphia: W. B. Saunders, pp. 196-198)。

これらの方法は、血清中のトリグリセライドをまずリポプロテインリパーゼでグリセロールに分解し、次にこれをグリセロールキナーゼでグリセロール-3-リン酸に変化させ、更にグリセロール-3-リン酸オキシダーゼでジヒドロキシアセトン-3-リン酸に変え、その時生成される過酸化水素をペルオキシダーゼ系で発色定量するものである。

また、グリセロール-3-リン酸オキシダーゼの代りにグリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼを作用させて、生成したNADHを定量する方法もある。

これらは、広く酵素的測定法と呼ばれている。

一方、LDL又はHDLに特定の界面活性剤と添加剤を選択的に作用させ、そこに含まれるコレステロールを定量する方法もすでに知られており (例えば、特開平9-313200号公報及び特開平9-285298号公報)、臨床検査などの目的で広く使われている。

しかし、VLDL、IDLに選択的に作用するか、又はカイロミクロン、LDL、HDLを排除するような試薬の組み合わせはまだ知られておらず、したがって前2者のリポ蛋白 (VLDL、IDL) に含まれるトリグリセライドを選択的に定量する方法及び試薬はこれまでに開示されていない。

発明の開示

本発明により解決しようとする課題は、試料中の超低比重リポ蛋白及び／又は中間比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライドを選択的に定量する方法及び試薬の確立である。

より具体的には、超遠心分離機による分離操作等の繁雑な操作を必要とせず、汎用されている自動分析装置への適用が可能であって、簡便かつ正確に定量が行える、超低比重リポ蛋白及び／又は中間比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライドを選択的に定量する方法及び試薬を確立することである。

本発明は、以下の発明を包含する。

(1) 被検試料に、選択的反応促進物質の存在下、トリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒する酵素を作用させ、生成する過酸化水素又は還元型補酵素の測定を行う、超低比重リポ蛋白及び／又は中間比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライドを選択的に定量する方法。

(2) 選択的反応促進物質が、超低比重リポ蛋白及び／又は中間比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライドを選択的に定量するためのものである前記(1)に記載の方法。

(3) 選択的反応促進物質の存在下、超低比重リポ蛋白及び／又は中間比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライドを選択的に、トリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒する酵素と反応させることにより、超低比重リポ蛋白及び／又は中間比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライドの定量を選択的に行う前記(1)又は(2)に記載の方法。

(4) 選択的反応促進物質が、超低比重リポ蛋白及び／又は中間比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライドを選択的に、トリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒する酵素と反応させるものである前記(3)に記載の方法。

(5) 第1段階として、選択的反応促進物質の存在下、超低比重リポ蛋白及び／又は中間比重リポ蛋白以外のリポ蛋白に含まれるトリグリセライドを選択的に、トリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒する酵素と反応させることにより、超低比重リポ蛋白及び／又は中間比重リポ

蛋白以外のリポ蛋白に含まれるトリグリセライドを消去し、

第2段階として、残存するトリグリセライドを、トリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒する酵素と反応させることにより、超低比重リポ蛋白及び／又は中間比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライドの定量を選択的に行う前記（1）又は（2）に記載の方法。

（6）第1段階において存在させる選択的反応促進物質が、超低比重リポ蛋白及び／又は中間比重リポ蛋白以外のリポ蛋白に含まれるトリグリセライドを選択的に、トリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒する酵素と反応させるものである前記（5）に記載の方法。

（7）第2段階において、第1段階に存在させた選択的反応促進物質とともにこの選択的反応促進物質とは異なる選択的反応促進物質を存在させる前記（5）又は（6）に記載の方法。

（8）第1段階に存在させた選択的反応促進物質とは異なる選択的反応促進物質が、超低比重リポ蛋白及び／又は中間比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライドを選択的に、トリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒する酵素と反応させるものである前記（7）に記載の方法。

（9）第1段階として、選択的反応促進物質の存在下、超低比重リポ蛋白、中間比重リポ蛋白、カイロミクロン、低比重リポ蛋白及び高比重リポ蛋白からなる群から選ばれる少なくとも1種のリポ蛋白に含まれるトリグリセライドを選択的に、トリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒する酵素と反応させることにより、超低比重リポ蛋白、中間比重リポ蛋白、カイロミクロン、低比重リポ蛋白及び高比重リポ蛋白からなる群から選ばれるリポ蛋白に含まれる前記トリグリセライドを消去し（但し、超低比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライド及び中間比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライドの両方の消去は行わない）、

第2段階として、選択的反応促進物質の存在下、残存するトリグリセライドのうち超低比重リポ蛋白及び／又は中間比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライドを選択的に、トリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一

連の反応を触媒する酵素と反応させることにより、超低比重リポ蛋白及び／又は中間比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライドの定量を選択的に行う前記（１）又は（２）に記載の方法。

（１０）第１段階において存在させる選択的反応促進物質と、第２段階において存在させる選択的反応促進物質が、下記の組み合わせ（i）～（iii）：

（i）

第１段階：

カイロミクロン、低比重リポ蛋白及び高比重リポ蛋白からなる群から選ばれる少なくとも１種のリポ蛋白に含まれるトリグリセライドを選択的に、トリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒する酵素と反応させることにより、カイロミクロン、低比重リポ蛋白及び高比重リポ蛋白からなる群から選ばれるリポ蛋白に含まれる前記トリグリセライドを消去することができる選択的反応促進物質、

第２段階：

第１段階において、トリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒する酵素と選択的に反応したカイロミクロン、低比重リポ蛋白及び／又は高比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライド、並びに超低比重リポ蛋白及び／又は中間比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライドを、前記のトリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒する酵素と反応させることができる選択的反応促進物質；

（ii）

第１段階：

カイロミクロン、低比重リポ蛋白及び高比重リポ蛋白からなる群から選ばれる少なくとも１種のリポ蛋白に含まれるトリグリセライド、並びに中間比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライドを選択的に、トリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒する酵素と反応させることにより、カイロミクロン、低比重リポ蛋白及び高比重リポ蛋白からなる群から選ばれるリポ蛋白に含まれる前記トリグリセライド、並びに中間比重リポ蛋白に含まれる前

記トリグリセライドを消去することができる選択的反応促進物質、

第2段階：

第1段階において、トリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒する酵素と選択的に反応したカイロミクロン、低比重リポ蛋白及び／又は高比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライド、並びに超低比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライド、更に場合によっては中間比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライドを、前記のトリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒する酵素と反応させることができる選択的反応促進物質；

(iii)

第1段階：

カイロミクロン、低比重リポ蛋白及び高比重リポ蛋白からなる群から選ばれる少なくとも1種のリポ蛋白に含まれるトリグリセライド、並びに超低比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライドを選択的に、トリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒する酵素と反応させることにより、カイロミクロン、低比重リポ蛋白及び高比重リポ蛋白からなる群から選ばれるリポ蛋白に含まれる前記トリグリセライド、並びに超低比重リポ蛋白に含まれる前記トリグリセライドを消去することができる選択的反応促進物質、

第2段階：

第1段階において、トリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒する酵素と選択的に反応したカイロミクロン、低比重リポ蛋白及び／又は高比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライド、並びに中間比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライド、更に場合によっては超低比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライドを、前記のトリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒する酵素と反応させることができる選択的反応促進物質；

のいずれかである前記(9)に記載の方法。

(11) トリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の

反応を触媒する酵素が、(i) リポプロテインリパーゼ、(ii) グリセロールキナーゼ、並びに (iii) グリセロール-3-リン酸オキシダーゼ及びグリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼのいずれか一方である前記 (1) ~ (10) のいずれかに記載の方法。

(12) 被検試料が、超低比重リポ蛋白、中間比重リポ蛋白、カイロミクロン、低比重リポ蛋白及び高比重リポ蛋白からなる群から選ばれる少なくとも1種を含む可能性のあるものである前記 (1) ~ (11) のいずれかに記載の方法。

(13) 選択的反応促進物質が、界面活性剤、ポリオキシアルキレン若しくはその誘導体、又は多糖類若しくはその誘導体である前記 (1) ~ (12) のいずれかに記載の方法。

(14) 選択的反応促進物質とともに反応補助物質を存在させる前記 (1) ~ (13) のいずれかに記載の方法。

(15) 反応補助物質が、ポリアニオン、ハロゲンイオン、金属イオン又はレクチンである前記 (14) に記載の方法。

(16) (i) 選択的反応促進物質、及び (ii) トリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒する酵素を含有する、試料中の超低比重リポ蛋白及び／又は中間比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライドを選択的に定量するための試薬。

(17) 選択的反応促進物質が、超低比重リポ蛋白及び／又は中間比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライドを選択的に定量するためのものである前記 (16) に記載の試薬。

(18) 選択的反応促進物質が、超低比重リポ蛋白及び／又は中間比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライドを選択的に、トリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒する酵素と反応させるものである前記 (16) 又は (17) に記載の試薬。

(19) 選択的反応促進物質が、超低比重リポ蛋白及び／又は中間比重リポ蛋白以外のリポ蛋白に含まれるトリグリセライドを選択的に、トリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒する酵素と反応させ、

これにより、超低比重リボ蛋白及び／又は中間比重リボ蛋白以外のリボ蛋白に含まれるトリグリセライドを消去するものである前記（１６）又は（１７）に記載の試薬。

（２０）試薬が第１試薬及び第２試薬よりなり、選択的反応促進物質が第１試薬に含有されるものである前記（１６）～（１９）のいずれかに記載の試薬。

（２１）試薬が第１試薬及び第２試薬よりなり、選択的反応促進物質が第２試薬に含有されるものである前記（１６）～（１９）のいずれかに記載の試薬。

（２２）試薬が第１試薬及び第２試薬よりなり、選択的反応促進物質が第１試薬及び第２試薬に含有されるものである前記（１６）～（１９）のいずれかに記載の試薬。

（２３）第２試薬に含有される選択的反応促進物質が、第１試薬に含有される選択的反応促進物質と同じ又は異なる選択的反応促進物質である前記（２２）に記載の試薬。

（２４）試薬が第１試薬及び第２試薬よりなり、第１試薬に含有される選択的反応促進物質が、超低比重リボ蛋白及び／又は中間比重リボ蛋白以外のリボ蛋白に含まれるトリグリセライドを選択的に、トリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒する酵素と反応させ、これにより、超低比重リボ蛋白及び／又は中間比重リボ蛋白以外のリボ蛋白に含まれるトリグリセライドを消去するものであって、

第２試薬に含有される選択的反応促進物質が、超低比重リボ蛋白及び／又は中間比重リボ蛋白に含まれるトリグリセライドを選択的に、トリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒する酵素と反応させるものである前記（１６）又は（１７）に記載の試薬。

（２５）試薬が第１試薬及び第２試薬よりなり、第１試薬に含有される選択的反応促進物質が、超低比重リボ蛋白、中間比重リボ蛋白、カイロミクロン、低比重リボ蛋白及び高比重リボ蛋白からなる群から選ばれる少なくとも１種のリボ蛋白に含まれるトリグリセライドを選択的に、トリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒する酵素と反応させ、これにより、

超低比重リボ蛋白、中間比重リボ蛋白、カイロミクロン、低比重リボ蛋白及び高比重リボ蛋白からなる群から選ばれるリボ蛋白に含まれる前記トリグリセライドを消去するものであり（但し、超低比重リボ蛋白に含まれるトリグリセライド及び中間比重リボ蛋白に含まれるトリグリセライドの両方の消去は行わない）。

第2試薬に含有される選択的反応促進物質が、残存するトリグリセライドのうち超低比重リボ蛋白及び／又は中間比重リボ蛋白に含まれるトリグリセライドを選択的に、トリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒する酵素と反応させるものである前記（16）又は（17）に記載の試薬。

（26）第1試薬において含有させる選択的反応促進物質と、第2試薬において含有させる選択的反応促進物質が、下記の組み合わせ（i）～（iii）：

（i）

第1試薬：

カイロミクロン、低比重リボ蛋白及び高比重リボ蛋白からなる群から選ばれる少なくとも1種のリボ蛋白に含まれるトリグリセライドを選択的に、トリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒する酵素と反応させることにより、カイロミクロン、低比重リボ蛋白及び高比重リボ蛋白からなる群から選ばれるリボ蛋白に含まれる前記トリグリセライドを消去することができる選択的反応促進物質、

第2試薬：

第1試薬において、トリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒する酵素と選択的に反応したカイロミクロン、低比重リボ蛋白及び／又は高比重リボ蛋白に含まれるトリグリセライド、並びに超低比重リボ蛋白及び／又は中間比重リボ蛋白に含まれるトリグリセライドを、前記のトリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒する酵素と反応させることができる選択的反応促進物質；

（ii）

第1試薬：

カイロミクロン、低比重リボ蛋白及び高比重リボ蛋白からなる群から選ばれる少なくとも1種のリボ蛋白に含まれるトリグリセライド、並びに中間比重リボ蛋白に含まれるトリグリセライドを選択的に、トリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒する酵素と反応させることにより、カイロミクロン、低比重リボ蛋白及び高比重リボ蛋白からなる群から選ばれるリボ蛋白に含まれる前記トリグリセライド、並びに中間比重リボ蛋白に含まれる前記トリグリセライドを消去することができる選択的反応促進物質、

第2試薬：

第1試薬において、トリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒する酵素と選択的に反応したカイロミクロン、低比重リボ蛋白及び／又は高比重リボ蛋白に含まれるトリグリセライド、並びに超低比重リボ蛋白に含まれるトリグリセライド、更に場合によっては中間比重リボ蛋白に含まれるトリグリセライドを、前記のトリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒する酵素と反応させることができる選択的反応促進物質；

(iii)

第1試薬：

カイロミクロン、低比重リボ蛋白及び高比重リボ蛋白からなる群から選ばれる少なくとも1種のリボ蛋白に含まれるトリグリセライド、並びに超低比重リボ蛋白に含まれるトリグリセライドを選択的に、トリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒する酵素と反応させることにより、カイロミクロン、低比重リボ蛋白及び高比重リボ蛋白からなる群から選ばれるリボ蛋白に含まれる前記トリグリセライド、並びに超低比重リボ蛋白に含まれる前記トリグリセライドを消去することができる選択的反応促進物質、

第2試薬：

第1試薬において、トリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒する酵素と選択的に反応したカイロミクロン、低比重リボ蛋白及び／又は高比重リボ蛋白に含まれるトリグリセライド、並びに中間比重

リポ蛋白に含まれるトリグリセライド、更に場合によっては超低比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライドを、前記のトリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒する酵素と反応させることができる選択的反応促進物質；

のいずれかである前記（２５）に記載の試薬。

（２７）トリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒する酵素が、(i) リポプロテインリパーゼ、(ii) グリセロールキナーゼ、並びに(iii) グリセロール－３－リン酸オキシダーゼ及びグリセロール－３－リン酸デヒドロゲナーゼのいずれか一方である前記（１６）～（２６）のいずれかに記載の試薬。

（２８）被検試料が、超低比重リポ蛋白、中間比重リポ蛋白、カイロミクロン、低比重リポ蛋白及び高比重リポ蛋白からなる群から選ばれる少なくとも１種を含む可能性のあるものである前記（１６）～（２７）のいずれかに記載の試薬。

（２９）選択的反応促進物質が、界面活性剤、ポリオキシアルキレン若しくはその誘導体、又は多糖類若しくはその誘導体である前記（１６）～（２８）のいずれかに記載の試薬。

（３０）選択的反応促進物質とともに反応補助物質を存在させる前記（１６）～（２９）のいずれかに記載の試薬。

（３１）反応補助物質が、ポリアニオン、ハロゲンイオン、金属イオン又はレクチンである前記（３０）に記載の試薬。

（３２）リポプロテインリパーゼ、グリセロールキナーゼ、グリセロール－３－リン酸オキシダーゼ（又はグリセロール－３－リン酸デヒドロゲナーゼ）などを組み合わせて血清中のトリグリセライドを定量する酵素比色法において、陽イオン性、陰イオン性、又は非イオン性の界面活性剤を作用させることにより、超低比重リポ蛋白（中間比重リポ蛋白も性状が類似しているためこれに含める）中のトリグリセライドを選択的に定量する方法。

（３３）リポプロテインリパーゼ、グリセロールキナーゼ、グリセロール－３－リン酸オキシダーゼ（又はグリセロール－３－リン酸デヒドロゲナーゼ）などを

組み合わせて血清中のトリグリセライドを定量する酵素的測定法において、陽イオン性、陰イオン性、又は非イオン性の界面活性剤を作用させることにより、カイロミクロン、低比重リポ蛋白、及び高比重リポ蛋白中のトリグリセライドを選択的に反応分解させ、その後、超低比重リポ蛋白（中間比重リポ蛋白も性状が類似しているためこれに含める）中のトリグリセライドを定量する方法。

（３４）前記（３２）に記載の超低比重リポ蛋白中トリグリセライド定量方法において、同リポ蛋白と界面活性剤との選択性を促進するポリアニオン、２価金属イオン、又は糖を添加する方法。

（３５）前記（３３）に記載の超低比重リポ蛋白中トリグリセライド定量方法において、カイロミクロン、LDL及びHDLと界面活性剤との選択性を促進するポリアニオン、２価金属イオン、又は糖を添加する方法。

以下、本発明を詳細に説明する。

I. 定量する方法

1. 定量する方法・総論

本発明の超低比重リポ蛋白及び／又は中間比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライドを選択的に定量する方法は、被検試料に、選択的反応促進物質の存在下、トリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒する酵素を作用させ、生成する過酸化水素又は還元型補酵素の測定を行うことよりなる。

この本発明の方法において、選択的反応促進物質は、超低比重リポ蛋白及び／又は中間比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライドを選択的に定量するためのものである。

2. 定量の方法の態様

① 態様－１　〔本発明の第１の方法〕

本発明の方法の態様の一つは、前記本発明の方法において、選択的反応促進物質の存在下、超低比重リポ蛋白及び／又は中間比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライドを選択的に、トリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒する酵素と反応させることにより、超低比重リポ蛋白及

び／又は中間比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライドの定量を選択的に行うものである。（本発明の第1の方法）

この際、選択的反応促進物質は、超低比重リポ蛋白及び／又は中間比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライドを選択的に、トリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒する酵素と反応させるものである。

なお、定量を第1段階と第2段階の2段階に分けて行うとき、選択的反応促進物質は、第1段階に存在させてもよく、第2段階に存在させてもよく、又は第1段階及び第2段階に存在させてもよい。いずれの場合も、同様の効果を得ることができる。

また、複数種類の選択的反応促進物質を組み合わせ、同時に存在させて使用することもできる。

② 態様－2　〔本発明の第2の方法〕

また、本発明の方法の態様の別なものとして、以下の方法を挙げることができる。

前記本発明の方法において、まず、第1段階として、選択的反応促進物質の存在下、超低比重リポ蛋白及び／又は中間比重リポ蛋白以外のリポ蛋白に含まれるトリグリセライドを選択的に、トリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒する酵素と反応させることにより、超低比重リポ蛋白及び／又は中間比重リポ蛋白以外のリポ蛋白に含まれるトリグリセライドを消去（分解）する。

次に、第2段階として、残存するトリグリセライドを、トリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒する酵素と反応させることにより、超低比重リポ蛋白及び／又は中間比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライドの定量を選択的に行うものである。（本発明の第2の方法）

この際、第1段階において存在させる選択的反応促進物質は、超低比重リポ蛋白及び／又は中間比重リポ蛋白以外のリポ蛋白に含まれるトリグリセライドを選択的に、トリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒する酵素と反応させるものである。

なお、第２段階において、第１段階に存在させた選択的反応促進物質とともにこの選択的反応促進物質とは異なる選択的反応促進物質を存在させてもよい。

この場合、第１段階に存在させた選択的反応促進物質とは異なる選択的反応促進物質は、超低比重リポ蛋白及び／又は中間比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライドを選択的に、トリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒する酵素と反応させるものであることが好ましい。

③ 態様－３　〔本発明の第３の方法〕

更に、本発明の方法の態様の他のものとして、以下の方法を挙げることができる。

前記本発明の方法において、まず、第１段階として、選択的反応促進物質の存在下、超低比重リポ蛋白、中間比重リポ蛋白、カイロミクロン、低比重リポ蛋白及び高比重リポ蛋白からなる群から選ばれる少なくとも１種のリポ蛋白に含まれるトリグリセライドを選択的に、トリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒する酵素と反応させることにより、超低比重リポ蛋白、中間比重リポ蛋白、カイロミクロン、低比重リポ蛋白及び高比重リポ蛋白からなる群から選ばれるリポ蛋白に含まれる前記トリグリセライドを消去（分解）する。（但し、超低比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライド及び中間比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライドの両方の消去は行わない。）

次に、第２段階として、選択的反応促進物質の存在下、残存するトリグリセライドのうち超低比重リポ蛋白及び／又は中間比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライドを選択的に、トリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒する酵素と反応させることにより、超低比重リポ蛋白及び／又は中間比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライドの定量を選択的に行うものである。（本発明の第３の方法）

この際、第１段階において存在させる選択的反応促進物質と、第２段階において存在させる選択的反応促進物質は、下記の（i）～（iii）の組み合わせより選択することもできる。

（i）

第1段階：

カイロミクロン、低比重リポ蛋白及び高比重リポ蛋白からなる群から選ばれる少なくとも1種のリポ蛋白に含まれるトリグリセライドを選択的に、トリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒する酵素と反応させることにより、カイロミクロン、低比重リポ蛋白及び高比重リポ蛋白からなる群から選ばれるリポ蛋白に含まれる前記トリグリセライドを消去することができる選択的反応促進物質。

第2段階：

第1段階において、トリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒する酵素と選択的に反応したカイロミクロン、低比重リポ蛋白及び／又は高比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライド、並びに超低比重リポ蛋白及び／又は中間比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライドを、前記のトリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒する酵素と反応させることができる選択的反応促進物質。

(ii)

第1段階：

カイロミクロン、低比重リポ蛋白及び高比重リポ蛋白からなる群から選ばれる少なくとも1種のリポ蛋白に含まれるトリグリセライド、並びに中間比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライドを選択的に、トリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒する酵素と反応させることにより、カイロミクロン、低比重リポ蛋白及び高比重リポ蛋白からなる群から選ばれるリポ蛋白に含まれる前記トリグリセライド、並びに中間比重リポ蛋白に含まれる前記トリグリセライドを、消去することができる選択的反応促進物質。

第2段階：

第1段階において、トリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒する酵素と選択的に反応したカイロミクロン、低比重リポ蛋白及び／又は高比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライド、並びに超低比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライド、更に場合によっては中間比重リポ蛋白に

含まれるトリグリセライドを、前記のトリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒する酵素と反応させることができる選択的反応促進物質。

(iii)

第1段階：

カイロミクロン、低比重リポ蛋白及び高比重リポ蛋白からなる群から選ばれる少なくとも1種のリポ蛋白に含まれるトリグリセライド、並びに超低比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライドを選択的に、トリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒する酵素と反応させることにより、カイロミクロン、低比重リポ蛋白及び高比重リポ蛋白からなる群から選ばれるリポ蛋白に含まれる前記トリグリセライド、並びに超低比重リポ蛋白に含まれる前記トリグリセライドを消去することができる選択的反応促進物質。

第2段階：

第1段階において、トリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒する酵素と選択的に反応したカイロミクロン、低比重リポ蛋白及び／又は高比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライド、並びに中間比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライド、更に場合によっては超低比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライドを、前記のトリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒する酵素と反応させることができる選択的反応促進物質。

3. トリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒する酵素

① トリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応

本発明の方法における、トリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応は、トリグリセライドが存在することにより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させることができる反応であれば、どのようなものでもよく、一つの反応からなるものでもよく、また、複数の反応からなるものであってもよい。

このような反応としては、例えば、試料中のリポ蛋白のトリグリセライドにリポプロテインリパーゼを作用させ、このトリグリセライドを1分子のグリセロールと3分子の脂肪酸に分解し、その後このグリセロールとアデノシン三リン酸（ATP）をグリセロールキナーゼの触媒作用によりグリセロール-3-リン酸とアデノシン二リン酸（ADP）に変え、更にこのグリセロール-3-リン酸をグリセロール-3-リン酸オキシダーゼの触媒作用によりジヒドロキシアセトン-3-リン酸に変えると同時に過酸化水素を生じさせる、一連の反応を挙げることができる。

また、他の例として、試料中のリポ蛋白のトリグリセライドにリポプロテインリパーゼを作用させ、このトリグリセライドを1分子のグリセロールと3分子の脂肪酸に分解し、その後このグリセロールとアデノシン三リン酸（ATP）をグリセロールキナーゼの触媒作用によりグリセロール-3-リン酸とアデノシン二リン酸（ADP）に変え、更にこのグリセロール-3-リン酸をニコチンアミドアデニンジヌクレオチド（酸化型）〔NAD⁺〕の存在下、グリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼの触媒作用によりジヒドロキシアセトンリン酸に変えると同時にニコチンアミドアデニンジヌクレオチド（還元型）〔NADH〕を生じさせる、一連の反応等をも挙げることができる。

なお、前記のグリセロールキナーゼを用いる反応においては、グリセロールが試料に含まれると定量値に正の誤差が生じる場合があるので、これを防ぐため、予め、試料に含まれるグリセロールに、グリセロールキナーゼ及びグリセロール-3-リン酸オキシダーゼ、更にカタラーゼ又はペルオキシダーゼを作用させて、このグリセロールを消去する一連の反応を行わせてもよい。

ここで、カタラーゼを用いるとき、消去反応終了後トリグリセライドの定量を行う際には、アジ化ナトリウムなどのカタラーゼの活性を阻害する物質等を存在させて、生成した過酸化水素がカタラーゼにより消去（分解）されないようにする必要がある。

なお、還元型補酵素としては、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド（還元型）〔NADH（還元型）〕、又はニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリ

酸（還元型）〔NADPH（還元型）〕等を挙げることができる。

② 酵素

本発明の方法において、トリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒する酵素は、トリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒するものであればいかなるものでもよいが、例えば、リボプロテインリパーゼ及びグリセロールキナーゼ、更にグリセロール-3-リン酸オキシダーゼ又はグリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼ等を挙げることができる。

これらの酵素は、例えば、細菌若しくはカビなどの微生物由来のもの、ヒト若しくはウシなどの動物由来のもの、植物由来のもの、又は遺伝子組み換え法により調製したもの等を用いることができる。

これらの酵素を存在させる濃度であるが、酵素の種類及び由来、選択的反応促進物質の種類、又は第1試薬と第2試薬の混合比率等により異なるので、一概には言えず、適宜その条件に適した濃度で存在させればよい。

なお、通常、リボプロテインリパーゼは、1～10,000,000単位/lの濃度で存在させることが好ましく、100～1,000,000単位/lの濃度で存在させることが特に好ましい。

また、グリセロールキナーゼは、通常、0.01～500,000単位/lの濃度で存在させることが好ましく、10～10,000単位/lの濃度で存在させることが特に好ましい。

そして、グリセロール-3-リン酸オキシダーゼは、通常、1～500,000単位/lの濃度で存在させることが好ましく、100～50,000単位/lの濃度で存在させることが特に好ましい。

なお、本来、酵素の活性値は、活性測定方法により異なるものであり、また、同じ活性測定方法、同じ酵素であっても、その酵素の由来、あるいは精製度等により異なるものでもある。

よって、先に記載した各酵素の濃度範囲を外れる酵素濃度（酵素活性値）だからといって、本発明の効果が得られないというものではない。

③ 酵素以外の物質

この本発明の方法におけるトリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応において、前記の酵素以外にも必要な物質があれば存在させる。

この反応に必要な物質としては、例えば、アデノシン三リン酸（ATP）若しくはその塩、マグネシウムイオン、又は酸化型補酵素等を挙げることができる。

アデノシン三リン酸又はその塩を存在させる濃度は、通常、0.001～50 g/lが好ましく、0.01～10 g/lが特に好ましい。

マグネシウムイオンは、ハロゲンイオン又は有機酸などとの塩の形態のものをを用いればよく、通常、0.001～100 mMの濃度で存在させることが好ましく、0.01～50 mMの濃度で存在させることが特に好ましい。

酸化型補酵素としては、例えば、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド（酸化型）〔NAD⁺（酸化型）〕、又はニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリオン酸（酸化型）〔NADP⁺（酸化型）〕等を挙げることができる。

4. 過酸化水素又は還元型補酵素の測定

本発明の定量する方法における、生成する過酸化水素又は還元型補酵素の測定は、前記の酵素により生成した過酸化水素又は還元型補酵素の量を測定することができる方法であればいかなる方法であってもよい。

例えば、生成した過酸化水素又は還元型補酵素から、何かしらのシグナルを導き出す方法等を挙げることができる。

より具体的には、過酸化水素の測定においては、過酸化水素電極等により過酸化水素自体を測定してもよく、又は過酸化水素から別のシグナルを導き出し、このシグナルを測定してもよい。

この過酸化水素から別のシグナルを導き出し測定する方法としては、例えば、ペルオキシダーゼ（POD）の存在のもとに、色原体を酸化させ色素を生成させて、この生成した色素の吸光度などを測定する、トリンダー反応系を利用する反応等を挙げることができる。

ペルオキシダーゼは、例えば、細菌若しくはカビなどの微生物由来のもの、ヒ

ト若しくはウシなどの動物由来のもの、西洋ワサビなどの植物由来のもの、又は遺伝子組み換え法により調製したもの等を用いることができる。

このペルオキシダーゼを存在させる濃度は、通常、30単位／1以上とすることが好ましい。

トリンダー反応系における色原体としては、例えば、4-アミノアンチピリンとフェノール若しくはその誘導体、又は4-アミノアンチピリンとアニリン誘導体との組み合わせ等を挙げることができる。

4-アミノアンチピリンは、通常、0.001～5.0g／1の濃度で存在させることが好ましく、0.01～10g／1の濃度で存在させることが特に好ましい。

フェノールの誘導体としては、例えば、4-クロロフェノール、2,4-ジクロロフェノール、2,4-ジブロモフェノール、若しくは2,4,6-トリクロロフェノール、又はこれらの塩等を挙げることができる。

アニリン誘導体としては、例えば、N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3,5-ジメトキシアニリン(HDAOS)、N-スルホプロピル-3,5-ジメトキシアニリン(HDAPS)、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3,5-ジメトキシアニリン(DAOS)、N-エチル-N-スルホプロピル-3,5-ジメトキシアニリン(DAPS)、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3,5-ジメトキシ-4-フルオロアニリン(FDAOS)、N-エチル-N-スルホプロピル-3,5-ジメトキシ-4-フルオロアニリン(FDAPS)、N-(2-カルボキシエチル)-N-エチル-3,5-ジメトキシアニリン(CEDB)、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3-メトキシアニリン(ADO S)、N-エチル-N-(3-スルホプロピル)-3-メトキシアニリン(AD P S)、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)アニリン(ALOS)、N-エチル-N-(3-スルホプロピル)アニリン(ALPS)、N-(3-スルホプロピル)アニリン(HALPS)、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3,5-ジメチルアニリン(MAOS)、

N-エチル-N-(3-スルホプロピル)-3,5-ジメチルアニリン(MAPS)、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3-メトキシアニリン(TOOS)、N-(2-カルボキシエチル)-N-エチル-3-メチルアニリン(CEMB)、若しくはN-(2-カルボキシエチル)-N-エチル-3-メトキシアニリン(CEMO)、又はこれらの塩等を挙げることもできる。

これらのフェノール若しくはその誘導体、又はアニリン誘導体は、通常、0.001~50g/lの濃度で存在させることが好ましく、0.01~10g/lの濃度で存在させることが特に好ましい。

また、還元型補酵素の測定においては、還元型補酵素自体を340nmなどにおける吸光度を測ることなどにより測定してもよく、又は還元型補酵素から別のシグナルを導き出し、このシグナルを測定してもよい。

この還元型補酵素から別のシグナルを導き出し測定する方法としては、例えば、ジアホラーゼ又は1-メトキシフェナジンメトサルフェートなどの存在のもとに、テトラゾリウム塩などを還元させ色素を生成させて、これを測定する反応等を挙げることができる。

5. 消去反応

本発明の第2の方法においては、第1段階で、選択的反応促進物質の存在下、超低比重リポ蛋白及び／又は中間比重リポ蛋白以外のリポ蛋白に含まれるトリグリセライドを選択的に、トリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒する酵素と反応させることにより、超低比重リポ蛋白及び／又は中間比重リポ蛋白以外のリポ蛋白に含まれるトリグリセライドの消去(分解)を行う。

また、本発明の第3の方法においては、第1段階で、選択的反応促進物質の存在下、超低比重リポ蛋白、中間比重リポ蛋白、カイロミクロン、低比重リポ蛋白及び高比重リポ蛋白からなる群から選ばれる少なくとも1種のリポ蛋白に含まれるトリグリセライドを選択的に、トリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒する酵素と反応させることにより、超低比重

リポ蛋白、中間比重リポ蛋白、カイロミクロン、低比重リポ蛋白及び高比重リポ蛋白からなる群から選ばれるリポ蛋白に含まれる前記トリグリセライドの消去（分解）を行う。（但し、超低比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライド及び中間比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライドの両方の消去は行わない。）

これらの消去（分解）は、選択的反応促進物質の存在下、試料を、トリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒する酵素と反応させることにより行うが、このトリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応についての詳細は、既に記述したとおりである。

この消去（分解）の反応により生成した過酸化水素又は還元型補酵素は、第2段階まで持ちこさずに、第1段階において消去することが好ましい。

過酸化水素の場合は、例えば、カタラーゼ又はペルオキシダーゼ等を存在させることにより、消去（分解）することができる。

カタラーゼは、例えば、細菌若しくはカビなどの微生物由来のもの、ヒト若しくはウシなどの動物由来のもの、植物由来のもの、又は遺伝子組み換え法により調製したもの等を用いることができる。

このカタラーゼを存在させる濃度は、通常、100単位／1以上とすることが好ましい。

そして、第1段階においてカタラーゼにより生成した過酸化水素を消去した後、第2段階においてはカタラーゼの活性を阻害して働かないようにする必要がある。

これは、アジ化ナトリウムなどのカタラーゼの活性を阻害する物質を、第2段階において存在させることにより、達成することができる。

また、ペルオキシダーゼは、例えば、細菌若しくはカビなどの微生物由来のもの、ヒト若しくはウシなどの動物由来のもの、西洋ワサビなどの植物由来のもの、又は遺伝子組み換え法により調製したもの等を用いることができる。

このペルオキシダーゼを存在させる濃度は、通常、30単位／1以上とすることが好ましい。

還元型補酵素の場合は、例えば、この還元型補酵素を補酵素とする脱水素酵素を存在させることにより消去（分解）することができる。

6. 他の物質

本発明の定量する方法においては、必要に応じて、更に、緩衝剤、他の酵素、他の酵素の基質、他の補酵素、アルカリ金属塩若しくはアルカリ土類金属塩などの金属イオン若しくはこれを含む塩、キレート剤、アルブミンなどのタンパク質、アジ化ナトリウム、抗生物質、若しくは合成抗菌剤などの防腐剤、糖類若しくは高分子化合物などの安定化剤、活性化剤、アスコルビン酸オキシダーゼなどの試料中に含まれる測定妨害物質の消去若しくは影響抑制に関わる物質、賦形剤、又は他の試薬成分等を適宜必要に応じて存在させることができる。

本発明の試薬において、試料と試薬を混合して定量を行う際のpHは、pH 5～10の範囲であることが好ましく、pH 5.5～9.0の範囲であることが特に好ましい。

定量を第1段階及び第2段階より行うときは、第2段階のpHが前記のpHの範囲となるように、第1段階のpHを設定してもよい。

緩衝剤を存在させる場合は、定量を行う際のpHが前記のpHの範囲となるような緩衝剤を存在させることが好ましい。

例えば、MES、Bis-Tris、Bis-Trisプロパン、ADA、PIPES、ACES、MOPSO、MOPS、BES、TES、HEPES、DIPSO、TAPSO、POPSO、HEPES、HEPPSO、EPPS、Tricine、Bicine、TAPS、CHES、リン酸、リン酸塩、ホウ酸、ホウ酸塩、グリシン、グリシルグリシン、イミダゾール、又はトリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン〔Tris〕等を挙げることができる。

5. 定量する方法の手順

本発明の定量する方法は、超低比重リポ蛋白及び／又は中間比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライドの定量を行おうとする試料に、選択的反応促進物質の存在下、トリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒する酵素を作用させ、生成する過酸化水素又は還元型補酵素の測定を行うものである。

この本発明の方法の定量操作は、一段階のみにて行う方法（1ステップ法、1

試薬系)で実施してもよく、又は二段階等の複数段階により行う方法(多ステップ法、多試薬系)で実施してもよい。

定量反応の開始方法は基質若しくは定量反応に必須な物質を加えることにより行う方法、又は試料を加えることにより行う方法等のいずれの方法でもよい。

定量操作時の温度は、30℃、又は37℃等定量反応が進行し、かつ定量反応に係わる酵素等の反応成分が熱により失活、又は変質しない範囲内の温度を設定すればよい。

また、本発明の方法において、生成する過酸化水素又は還元型補酵素の測定は、反応速度法(レート法)、又は終点法(エンドポイント法)等のいずれの方法によるものでもよい。

生成する過酸化水素又は還元型補酵素の測定において、吸光度等の測定によりこれを行う場合、測定波長は測定する物質に応じて、紫外部、可視部、又は赤外部の適当な波長を使用すればよい。

なお、吸光度等の測定は、一波長のみの測定でもよく、又は二波長による測定でもよい。

本発明の方法において、定量の手法は用手法、又は自動分析装置などの装置による方法のいずれをも用いることができる。

この装置としては、例えば、臨床検査用の自動分析装置等を挙げることができる。

この臨床検査用の自動分析装置の例として、コンティニュアスフロー式若しくはフローインジェクション式などのフロー方式の自動分析装置、クローズドタイプ・バッチ式、オープンタイプ・バッチ式、パック式若しくは遠心式などのディスクリット方式の自動分析装置、又はフィルム式、若しくは試験片式などのドライケミストリー方式の自動分析装置等を挙げることができる。

装置により定量を行う手順の一例を以下に示す。

まず、本発明の定量する試薬を、使用する装置に適合した容器に入れる。

この試薬が入った容器を装置の所定の位置に置く。

また、定量を行う試料も測定装置に適合した容器に入れ、所定の位置に置く。

装置が臨床検査用の自動分析装置の場合は、使用する試薬、及び定量を行おうとする試料等についての定量条件（定量パラメータ）等を装置に入力し、設定する。

そして、定量を開始する。

通常は、試料と試薬のそれぞれをピペット（プローブ）又はチューブ等で反応セル（反応キュベット）に分注し、混合、接触させ、温度一定の条件下に保つ。

そして、この反応セル（反応キュベット）内の試料と試薬との反応液について、規定波長の吸光度を定められた時間に測定する。

また、例えば、試薬が第1試薬と第2試薬の2試薬からなる場合は、まず、試料と試薬の第1試薬のそれぞれをピペット（プローブ）、又はチューブ等で反応セル（反応キュベット）に分注し、混合、接触させ、温度一定の条件下に保つ。

次に、この反応セル（反応キュベット）内の反応液に、試薬の第2試薬をピペット（プローブ）又はチューブ等で分注し、混合、接触させて、温度一定の条件下に保つ。

そして、この反応セル（反応キュベット）内の試料と試薬の第1試薬及び第2試薬との反応液について、規定波長の吸光度を定められた時間に測定する。

ここで得られた吸光度と濃度既知のトリグリセライド試料（標準液）の吸光度〔検量線〕を比較することにより、試料中の超低比重リポ蛋白及び／又は中間比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライドの濃度を算出して得る。

II. 定量する試薬

1. 定量する試薬・総論

本発明の試料中の超低比重リポ蛋白及び／又は中間比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライドを選択的に定量するための試薬は、(i) 選択的反応促進物質、及び(ii) トリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒する酵素を含有するものである。

この本発明の試薬において、選択的反応促進物質は、超低比重リポ蛋白及び／又は中間比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライドを選択的に定量するためのものである。

2. 試薬の態様

① 態様－1 [本発明の第1の試薬]

本発明の試薬の態様の一つは、前記本発明の試薬において含有させる選択的反応促進物質が、超低比重リポ蛋白及び／又は中間比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライドを選択的に、トリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒する酵素と反応させるものである。（本発明の第1の試薬）

なお、試薬が第1試薬及び第2試薬よりなるとき、選択的反応促進物質は、第1試薬に含有させてもよく、第2試薬に含有させてもよく、又は第1試薬及び第2試薬に含有させてもよい。いずれの場合も、同様の効果を得ることができる。

また、複数種類の選択的反応促進物質を組み合わせ、同時に含有させて使用することもできる。

② 態様－2 [本発明の第2の試薬]

また、本発明の試薬の態様の別なものとして、以下の試薬を挙げることができる。

前記本発明の試薬において、試薬が第1試薬及び第2試薬よりなり、第1試薬に含有される選択的反応促進物質が、超低比重リポ蛋白及び／又は中間比重リポ蛋白以外のリポ蛋白に含まれるトリグリセライドを選択的に、トリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒する酵素と反応させ、これにより、超低比重リポ蛋白及び／又は中間比重リポ蛋白以外のリポ蛋白に含まれるトリグリセライドを消去（分解）するものである。（本発明の第2の試薬）

なお、第2試薬において、第1試薬に含有させた選択的反応促進物質とともにこの選択的反応促進物質とは異なる選択的反応促進物質を含有させてもよい。

この場合、第2試薬に含有させる、第1試薬に含有させた選択的反応促進物質とは異なる選択的反応促進物質は、超低比重リポ蛋白及び／又は中間比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライドを選択的に、トリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒する酵素と反応させるものである。

ことが好ましい。

③ 態様－3 [本発明の第3の試薬]

更に、本発明の試薬の態様の他のものとして、以下の試薬を挙げることができる。

前記本発明の試薬において、試薬が第1試薬及び第2試薬よりなり、第1試薬に含有される選択的反応促進物質が、超低比重リポ蛋白、中間比重リポ蛋白、カイロミクロン、低比重リポ蛋白及び高比重リポ蛋白からなる群から選ばれる少なくとも1種のリポ蛋白に含まれるトリグリセライドを選択的に、トリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒する酵素と反応させ、これにより、超低比重リポ蛋白、中間比重リポ蛋白、カイロミクロン、低比重リポ蛋白及び高比重リポ蛋白からなる群から選ばれるリポ蛋白に含まれる前記トリグリセライドを消去（分解）するものである。（但し、超低比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライド及び中間比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライドの両方の消去は行わない。）

そして、第2試薬に含有される選択的反応促進物質が、残存するトリグリセライドのうち超低比重リポ蛋白及び／又は中間比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライドを選択的に、トリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒する酵素と反応させるものである。（本発明の第3の試薬）

この際、第1試薬において含有させる選択的反応促進物質と、第2試薬において含有させる選択的反応促進物質は、下記の（i）～（iii）の組み合わせより選択することもできる。

（i）

第1試薬：

カイロミクロン、低比重リポ蛋白及び高比重リポ蛋白からなる群から選ばれる少なくとも1種のリポ蛋白に含まれるトリグリセライドを選択的に、トリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒する酵素と反応させることにより、カイロミクロン、低比重リポ蛋白及び高比重リポ蛋白

からなる群から選ばれるリポ蛋白に含まれる前記トリグリセライドを消去することができる選択的反応促進物質。

第2試薬：

第1試薬において、トリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒する酵素と選択的に反応したカイロミクロン、低比重リポ蛋白及び／又は高比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライド、並びに超低比重リポ蛋白及び／又は中間比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライドを、前記のトリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒する酵素と反応させることができる選択的反応促進物質。

(ii)

第1試薬：

カイロミクロン、低比重リポ蛋白及び高比重リポ蛋白からなる群から選ばれる少なくとも1種のリポ蛋白に含まれるトリグリセライド、並びに中間比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライドを選択的に、トリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒する酵素と反応させることにより、カイロミクロン、低比重リポ蛋白及び高比重リポ蛋白からなる群から選ばれるリポ蛋白に含まれる前記トリグリセライド、並びに中間比重リポ蛋白に含まれる前記トリグリセライドを消去することができる選択的反応促進物質。

第2試薬：

第1試薬において、トリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒する酵素と選択的に反応したカイロミクロン、低比重リポ蛋白及び／又は高比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライド、並びに超低比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライド、更に場合によっては中間比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライドを、前記のトリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒する酵素と反応させることができる選択的反応促進物質。

(iii)

第1試薬：

カイロミクロン、低比重リポ蛋白及び高比重リポ蛋白からなる群から選ばれる少なくとも1種のリポ蛋白に含まれるトリグリセライド、並びに超低比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライドを選択的に、トリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒する酵素と反応させることにより、カイロミクロン、低比重リポ蛋白及び高比重リポ蛋白からなる群から選ばれるリポ蛋白に含まれる前記トリグリセライド、並びに超低比重リポ蛋白に含まれる前記トリグリセライドを消去することができる選択的反応促進物質。

第2試薬：

第1試薬において、トリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒する酵素と選択的に反応したカイロミクロン、低比重リポ蛋白及び／又は高比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライド、並びに中間比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライド、更に場合によっては超低比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライドを、前記のトリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒する酵素と反応させることができる選択的反応促進物質。

3. トリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒する酵素

① トリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応

本発明の試薬における、トリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応は、トリグリセライドが存在することにより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させることができる反応であれば、どのようなものでもよく、一つの反応からなるものでもよく、また、複数の反応からなるものであってもよい。

このような反応としては、例えば、試料中のリポ蛋白のトリグリセライドにリポプロテインリパーゼを作用させ、このトリグリセライドを1分子のグリセロールと3分子の脂肪酸に分解し、その後このグリセロールとアデノシン三リン酸（ATP）をグリセロールキナーゼの触媒作用によりグリセロール-3-リン酸とアデノシン二リン酸（ADP）に変え、更にこのグリセロール-3-リン酸を

グリセロール-3-リン酸オキシダーゼの触媒作用によりジヒドロキシアセトン-3-リン酸に変えると同時に過酸化水素を生じさせる、一連の反応を挙げることができる。

また、他の例として、試料中のリボ蛋白のトリグリセライドにリボプロテインリパーゼを作用させ、このトリグリセライドを1分子のグリセロールと3分子の脂肪酸に分解し、その後このグリセロールとアデノシン三リン酸 (ATP) をグリセロールキナーゼの触媒作用によりグリセロール-3-リン酸とアデノシン二リン酸 (ADP) に変え、更にこのグリセロール-3-リン酸をニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (酸化型) $[NAD^+]$ の存在下、グリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼの触媒作用によりジヒドロキシアセトン-3-リン酸に変えると同時にニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (還元型) $[NADH]$ を生じさせる、一連の反応等をも挙げることができる。

なお、前記のグリセロールキナーゼを用いる反応においては、グリセロールが試料に含まれると定量値に正の誤差が生じる場合があるので、これを防ぐため、予め、試料に含まれるグリセロールに、グリセロールキナーゼ及びグリセロール-3-リン酸オキシダーゼ、更にカタラーゼ又は等を作用させて、このグリセロールを消去する一連の反応を行わせてもよい。

ここで、カタラーゼを用いるとき、消去反応終了後トリグリセライドの定量を行う際には、アジ化ナトリウムなどのカタラーゼの活性を阻害する物質等を第2試薬に含有させて、生成した過酸化水素がカタラーゼにより消去 (分解) されないようにする必要がある。

なお、還元型補酵素としては、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (還元型) $[NADH]$ (還元型)、又はニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリノ酸 (還元型) $[NADPH]$ (還元型) 等を挙げることができる。

② 酵素

本発明の試薬において、トリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒する酵素は、トリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒するものであればいかなるものでも

よいが、例えば、リボプロテインリパーゼ及びグリセロールキナーゼ、更にグリセロール-3-リン酸オキシダーゼ又はグリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼ等を挙げることができる。

これらの酵素は、例えば、細菌若しくはカビなどの微生物由来のもの、ヒト若しくはウシなどの動物由来のもの、植物由来のもの、又は遺伝子組み換え法により調製したもの等を用いることができる。

これらの酵素を試薬に含有させる濃度であるが、酵素の種類及び由来、選択的反応促進物質の種類、又は第1試薬と第2試薬の混合比率等により異なるので、一概には言えず、適宜その条件に適した濃度で含有させればよい。

なお、通常、リボプロテインリパーゼは、1～10,000,000単位/lの濃度で含有させることが好ましく、100～1,000,000単位/lの濃度で含有させることが特に好ましい。

また、グリセロールキナーゼは、通常、0.01～500,000単位/lの濃度で含有させることが好ましく、10～10,000単位/lの濃度で含有させることが特に好ましい。

そして、グリセロール-3-リン酸オキシダーゼは、通常、1～500,000単位/lの濃度で含有させることが好ましく、100～50,000単位/lの濃度で含有させることが特に好ましい。

なお、本来、酵素の活性値は、活性測定方法により異なるものであり、また、同じ活性測定方法、同じ酵素であっても、その酵素の由来、あるいは精製度等により異なるものでもある。

よって、先に記載した各酵素の濃度範囲を外れる酵素濃度（酵素活性値）だからといって、本発明の効果が得られないというものではない。

③ 酵素以外の物質

この本発明の試薬において、トリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応における、前記の酵素以外にも必要な物質があれば含有させる。

この反応に必要な物質としては、例えば、アデノシン三リン酸（ATP）若し

くはその塩、マグネシウムイオン、又は酸化型補酵素等を挙げることができる。

アデノシン三リン酸又はその塩を含有させる濃度は、通常、0.001～50 g/l が好ましく、0.01～10 g/l が特に好ましい。

マグネシウムイオンは、ハロゲンイオン又は有機酸などとの塩の形態のものを
用いればよく、通常、0.001～100 mMの濃度で含有させることが好まし
く、0.01～50 mMの濃度で含有させることが特に好ましい。

酸化型補酵素としては、例えば、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド（酸
化型）〔NAD⁺（酸化型）〕、又はニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリ
ン酸（酸化型）〔NADP⁺（酸化型）〕等を挙げることができる。

4. 過酸化水素又は還元型補酵素の測定

本発明の定量する試薬においては、生成する過酸化水素又は還元型補酵素の測
定は、前記の酵素により生成した過酸化水素又は還元型補酵素の量を測定するこ
とができる方法であればいかなる方法を用いたものであってもよい。

例えば、生成した過酸化水素又は還元型補酵素から、何かしらのシグナルを導
き出す方法等を挙げることができる。

より具体的には、過酸化水素の測定においては、過酸化水素電極等により過酸
化水素自体を測定してもよく、又は過酸化水素から別のシグナルを導き出し、こ
のシグナルを測定してもよい。

この過酸化水素から別のシグナルを導き出し測定する方法としては、例えば、
ペルオキシダーゼ（POD）の存在のもとに、色原体を酸化させ色素を生成させ
て、この生成した色素の吸光度などを測定する、トリンダー反応系を利用する反
応等を挙げることができる。

また、還元型補酵素の測定においては、還元型補酵素自体を340 nmなどに
おける吸光度を測ることなどにより測定してもよく、又は還元型補酵素から別の
シグナルを導き出し、このシグナルを測定してもよい。

この還元型補酵素から別のシグナルを導き出し測定する方法としては、例えば、
ジアホラーゼ又は1-メトキシフェナジンメトサルフェートなどの存在のもと
に、テトラゾリウム塩などを還元させ色素を生成させて、これを測定する反応等

を挙げることができる。

5. 消去反応

本発明の第2の試薬においては、試薬が第1試薬及び第2試薬よりなり、第1試薬に含有される選択的反応促進物質が、超低比重リポ蛋白及び／又は中間比重リポ蛋白以外のリポ蛋白に含まれるトリグリセライドを選択的に、トリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒する酵素と反応させ、これにより、超低比重リポ蛋白及び／又は中間比重リポ蛋白以外のリポ蛋白に含まれるトリグリセライドを消去（分解）するものである。

また、本発明の第3の試薬においては、試薬が第1試薬及び第2試薬よりなり、第1試薬に含有される選択的反応促進物質が、超低比重リポ蛋白、中間比重リポ蛋白、カイロミクロン、低比重リポ蛋白及び高比重リポ蛋白からなる群から選ばれる少なくとも1種のリポ蛋白に含まれるトリグリセライドを選択的に、トリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒する酵素と反応させ、これにより、超低比重リポ蛋白、中間比重リポ蛋白、カイロミクロン、低比重リポ蛋白及び高比重リポ蛋白からなる群から選ばれるリポ蛋白に含まれる前記トリグリセライドを消去（分解）するものである。（但し、超低比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライド及び中間比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライドの両方の消去は行わない。）

これらの消去（分解）は、第1試薬に含有させた選択的反応促進物質の存在下、試料を、トリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒する酵素と反応させることにより行うが、このトリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応についての詳細は、既に記述したとおりである。

この消去（分解）の反応により生成した過酸化水素又は還元型補酵素は、試料と第1試薬を混合し反応させる第1段階において消去して、更に第2試薬を混合させる第2段階まで持ちこさないことが好ましい。

過酸化水素の場合は、例えば、カタラーゼ又はペルオキシダーゼ等を第1試薬に含有させることにより、第1段階で発生した過酸化水素を消去（分解）するこ

とができる。

カタラーゼは、例えば、細菌若しくはカビなどの微生物由来のもの、ヒト若しくはウシなどの動物由来のもの、植物由来のもの、又は遺伝子組み換え法により調製したもの等を用いることができる。

このカタラーゼを含有させる濃度は、通常、100単位/1以上とすることが好ましい。

そして、第1段階においてカタラーゼにより生成した過酸化水素を消去した後、第2段階においてはカタラーゼの活性を阻害して働かないようにする必要がある。

これは、アジ化ナトリウムなどのカタラーゼの活性を阻害する物質を、第2試薬に含有させること等により、達成することができる。

また、ペルオキシダーゼは、例えば、細菌若しくはカビなどの微生物由来のもの、ヒト若しくはウシなどの動物由来のもの、西洋ワサビなどの植物由来のもの、又は遺伝子組み換え法により調製したもの等を用いることができる。

このペルオキシダーゼを含有させる濃度は、通常、30単位/1以上とすることが好ましい。

還元型補酵素の場合は、例えば、この還元型補酵素を補酵素とする脱水素酵素を第1試薬に含有させること等により消去（分解）することができる。

6. 試薬の組成

本発明の定量する試薬は、(i)選択的反応促進物質、及び(ii)トリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒する酵素を含有するものである。

本発明の試薬においては、前記の酵素によるトリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応に必要な物質をも含有させる。

この反応に必要な物質として、ペルオキシダーゼ（POD）、トリンダー反応系における色原体、還元型補酵素、又は緩衝剤等を例示することができる。

ペルオキシダーゼは、例えば、細菌若しくはカビなどの微生物由来のもの、ヒト若しくはウシなどの動物由来のもの、西洋ワサビなどの植物由来のもの、又は遺伝子組み換え法により調製したもの等を用いることができる。

このペルオキシダーゼを含有させる濃度は、通常、30単位/1以上とすることが好ましい。

トリンダー反応系における色原体としては、例えば、4-アミノアンチピリンとフェノール若しくはその誘導体、又は4-アミノアンチピリンとアニリン誘導体との組み合わせ等を挙げることができる。

4-アミノアンチピリンは、通常、0.001~50g/1の濃度で含有させることが好ましく、0.01~10g/1の濃度で含有させることが特に好ましい。

フェノールの誘導体としては、例えば、4-クロロフェノール、2,4-ジクロロフェノール、2,4-ジブロモフェノール、若しくは2,4,6-トリクロロフェノール、又はこれらの塩等を挙げることができる。

アニリン誘導体としては、例えば、N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3,5-ジメトキシアニリン(HDAOS)、N-スルホプロピル-3,5-ジメトキシアニリン(HDAPS)、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3,5-ジメトキシアニリン(DAOS)、N-エチル-N-スルホプロピル-3,5-ジメトキシアニリン(DAPS)、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3,5-ジメトキシ-4-フルオロアニリン(FDAOS)、N-エチル-N-スルホプロピル-3,5-ジメトキシ-4-フルオロアニリン(FDAPS)、N-(2-カルボキシエチル)-N-エチル-3,5-ジメトキシアニリン(CEDB)、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3-メトキシアニリン(ADOS)、N-エチル-N-(3-スルホプロピル)-3-メトキシアニリン(ADPS)、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)アニリン(ALOS)、N-エチル-N-(3-スルホプロピル)アニリン(ALPS)、N-(3-スルホプロピル)アニリン(HALPS)、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3,5-ジメチルアニリン(MAOS)、N-エチル-N-(3-スルホプロピル)-3,5-ジメチルアニリン(MAPS)、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3-メトキ

シアニリン (TOOS)、N-(2-カルボキシエチル)-N-エチル-3-メチルアニリン (CEMB)、若しくはN-(2-カルボキシエチル)-N-エチル-3-メトキシアニリン (CEMO)、又はこれらの塩等を挙げることができる。

これらのフェノール若しくはその誘導体、又はアニリン誘導体は、通常、0.001~50 g/lの濃度で含有させることが好ましく、0.01~10 g/lの濃度で含有させることが特に好ましい。

本発明の試薬において、試料と試薬を混合して定量を行う際のpHは、pH5~10の範囲であることが好ましく、pH5.5~9.0の範囲であることが特に好ましい。

試薬が第1試薬及び第2試薬よりなるときは、試料と第1試薬を混合し、更に第2試薬を混合した後のpHが前記のpHの範囲となるように、第1試薬及び第2試薬のpHを設定してもよい。

緩衝剤を含有させる場合は、定量を行う際のpHが前記のpHの範囲となるような緩衝剤を含有させることが好ましい。

例えば、MES、Bis-Tris、Bis-Trisプロパン、ADA、PIPES、ACES、MOPSO、MOPS、BES、TES、HEPES、DIPSO、TAPSO、POPSO、HEPES、HEPPSO、EPPS、Tricine、Bicine、TAPS、CHES、リン酸、リン酸塩、ホウ酸、ホウ酸塩、グリシン、グリシルグリシン、イミダゾール、又はトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン〔Tris〕等を挙げることができる。

本発明の試薬には、更に、他の酵素、他の酵素の基質、他の補酵素、アルカリ金属塩若しくはアルカリ土類金属塩などの金属イオン若しくはこれを含む塩、キレート剤、アルブミンなどのタンパク質、アジ化ナトリウム、抗生物質、若しくは合成抗菌剤などの防腐剤、糖類若しくは高分子化合物などの安定化剤、活性化剤、アスコルビン酸オキシダーゼなどの試料中に含まれる測定妨害物質の消去若しくは影響抑制に関わる物質、賦形剤、又は他の試薬成分等を適宜必要に応じて含有させることができる。

本発明の試薬は、1試薬のものでもよいが、必要に応じて2試薬以上に試薬成分を含有させて構成してもよい。

Ⅲ. 本発明の方法及び試薬に共通する事項

1. 被検試料

本発明の方法及び試薬において、被検試料は、超低比重リポ蛋白及び／又は中間比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライドが存在する可能性があり、超低比重リポ蛋白及び／又は中間比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライドの定量を行おうとするものであれば、どのようなものでもよい。

この被検試料としては、超低比重リポ蛋白、中間比重リポ蛋白、カイロミクロン、低比重リポ蛋白及び高比重リポ蛋白からなる群から選ばれる少なくとも1種を含む可能性のあるものが好ましい。

特に、超低比重リポ蛋白及び／又は中間比重リポ蛋白を含む可能性のあるものが好ましい。

このようなものの例として、ヒト又は動物の血液、血清、血漿等の体液；ヒト若しくは動物の臓器又は筋肉等の抽出液；ヒト又は動物の糞便の抽出液；細胞又は菌体の抽出液；あるいは植物の抽出液等を挙げることができる。

2. リポ蛋白

本明細書において、リポ蛋白としては、主要な、カイロミクロン、超低比重リポ蛋白、中間比重リポ蛋白、低比重リポ蛋白、及び高比重リポ蛋白について記載している。

しかしながら、厳密には、これらの主要な5種類のリポ蛋白以外のリポ蛋白も存在する。

よって、本明細書において、超低比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライドは、中間比重リポ蛋白、カイロミクロン、低比重リポ蛋白、及び高比重リポ蛋白以外のリポ蛋白に含まれるトリグリセライドと同義とする。

また、中間比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライドは、超低比重リポ蛋白、カイロミクロン、低比重リポ蛋白、及び高比重リポ蛋白以外のリポ蛋白に含まれるトリグリセライドと同義とする。

そして、超低比重リポ蛋白及び中間比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライドは、カイロミクロン、低比重リポ蛋白、及び高比重リポ蛋白以外のリポ蛋白に含まれるトリグリセライドと同義とする。

3. 選択的反応促進物質

① 選択的反応促進物質

本発明の方法及び試薬において、選択的反応促進物質は、試料中の超低比重リポ蛋白及び／又は中間比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライドを選択的に定量するためのものである。

② 選択的反応促進物質の例示

この本発明の方法及び試薬における選択的反応促進物質の例として、次のa)～i)のものを挙げる。

a) 超低比重リポ蛋白及び／又は中間比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライドを選択的に、トリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒する酵素と反応させるもの。

b) 超低比重リポ蛋白及び／又は中間比重リポ蛋白以外のリポ蛋白に含まれるトリグリセライドを選択的に、トリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒する酵素と反応させるもの。

これにより、超低比重リポ蛋白及び／又は中間比重リポ蛋白以外のリポ蛋白に含まれるトリグリセライドは消去される。

c) 超低比重リポ蛋白、中間比重リポ蛋白、カイロミクロン、低比重リポ蛋白及び高比重リポ蛋白からなる群から選ばれる少なくとも1種のリポ蛋白に含まれるトリグリセライドを選択的に、トリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒する酵素と反応させるもの。

これにより、超低比重リポ蛋白、中間比重リポ蛋白、カイロミクロン、低比重リポ蛋白及び高比重リポ蛋白からなる群から選ばれるリポ蛋白に含まれる前記トリグリセライドは消去される。

(但し、超低比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライド及び中間比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライドの両方の消去は行わないもの。)

d) カイロミクロン、低比重リポ蛋白及び高比重リポ蛋白からなる群から選ばれる少なくとも1種のリポ蛋白に含まれるトリグリセライドを選択的に、トリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒する酵素と反応させるもの。

これにより、カイロミクロン、低比重リポ蛋白及び高比重リポ蛋白からなる群から選ばれるリポ蛋白に含まれる前記トリグリセライドが消去される。

e) 前記d)の消去処理において、トリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒する酵素と選択的に反応したカイロミクロン、低比重リポ蛋白及び／又は高比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライド、並びに超低比重リポ蛋白及び／又は中間比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライドを、前記のトリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒する酵素と反応させるもの。

f) カイロミクロン、低比重リポ蛋白及び高比重リポ蛋白からなる群から選ばれる少なくとも1種のリポ蛋白に含まれるトリグリセライド、並びに中間比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライドを選択的に、トリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒する酵素と反応させるもの。

これにより、カイロミクロン、低比重リポ蛋白及び高比重リポ蛋白からなる群から選ばれるリポ蛋白に含まれる前記トリグリセライド、並びに中間比重リポ蛋白に含まれる前記トリグリセライドは消去される。

g) 前記f)の消去処理において、トリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒する酵素と選択的に反応したカイロミクロン、低比重リポ蛋白及び／又は高比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライド、並びに超低比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライド、更に場合によっては中間比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライドを、前記のトリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒する酵素と反応させるもの。

h) カイロミクロン、低比重リポ蛋白及び高比重リポ蛋白からなる群から選ばれる少なくとも1種のリポ蛋白に含まれるトリグリセライド、並びに超低比重リ

ポ蛋白に含まれるトリグリセライドを選択的に、トリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒する酵素と反応させるもの。

これにより、カイロミクロン、低比重リポ蛋白及び高比重リポ蛋白からなる群から選ばれるリポ蛋白に含まれる前記トリグリセライド、並びに超低比重リポ蛋白に含まれる前記トリグリセライドは消去される。

i) 前記h)の消去処理において、トリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒する酵素と選択的に反応したカイロミクロン、低比重リポ蛋白及び／又は高比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライド、並びに中間比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライド、更に場合によっては超低比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライドを、前記のトリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒する酵素と反応させるもの。

③ 選択的反応促進物質の反応促進性によるタイプ分け

選択的反応促進物質の存在下、超低比重リポ蛋白、中間比重リポ蛋白、カイロミクロン（以下、場合により「CM」という。）、低比重リポ蛋白、又は高比重リポ蛋白の各リポ蛋白に含まれるトリグリセライドが、トリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒する酵素と反応する場合、各々のリポ蛋白に含まれるトリグリセライドを前記酵素と反応させることができる選択的反応促進物質のタイプを表1に示した。

表1 各タイプ可溶化剤の各種リポ蛋白に含まれるトリグリセライドとの反応性のパターン〔計31通り〕

1. 「1種類のリポ蛋白と反応の場合」（5通り；1～5）

タイプ	CM	VLDL	IDL	LDL	HDL
1	CM				
2		VLDL			
3			IDL		
4				LDL	
5					HDL

Ⅱ. 「2種類のリポ蛋白と反応の場合」 (10通り; 6~15)

タイプ	CM	VLDL	IDL	LDL	HDL
6	CM	VLDL			
7	CM		IDL		
8	CM			LDL	
9	CM				HDL
10		VLDL	IDL		
11		VLDL		LDL	
12		VLDL			HDL
13			IDL	LDL	
14			IDL		HDL
15				LDL	HDL

Ⅲ. 「3種類のリポ蛋白と反応の場合」 (10通り; 16~25)

タイプ	CM	VLDL	IDL	LDL	HDL
16	CM	VLDL	IDL		
17	CM	VLDL		LDL	
18	CM	VLDL			HDL
19	CM		IDL	LDL	
20	CM		IDL		HDL
21	CM			LDL	HDL
22		VLDL	IDL	LDL	
23		VLDL	IDL		HDL
24		VLDL		LDL	HDL
25			IDL	LDL	HDL

IV. 「4種類のリポ蛋白と反応の場合」(5通り; 26~30)

タイプ	CM	VLDL	IDL	LDL	HDL
26	CM	VLDL	IDL	LDL	
27	CM	VLDL	IDL		HDL
28	CM	VLDL		LDL	HDL
29	CM		IDL	LDL	HDL
30		VLDL	IDL	LDL	HDL

V. 「5種類のリポ蛋白と反応の場合」(1通り; 31)

タイプ	CM	VLDL	IDL	LDL	HDL
31	CM	VLDL	IDL	LDL	HDL

この表より分かるように、反応促進性により分類した選択的反応促進物質のタイプは、タイプ1~タイプ31までの31通りである。

④ 各タイプ選択的反応促進物質の使用方法

本発明の方法(又は試薬)において、前記③の表1でタイプ分けした選択的反応促進物質を、どのように使用することができるかについて、以下説明する。

a) 本発明の第1の方法(又は第1の試薬)の場合

前記の本発明の第1の方法(又は第1の試薬)の場合、超低比重リポ蛋白及び中間比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライドを定量するのには、表1におけるタイプ10の選択的反応促進物質を存在(又は含有)させればよい。

また、超低比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライドを定量するのには、タイプ2の選択的反応促進物質を存在(又は含有)させればよい。

そして、中間比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライドを定量するのには、タイプ3の選択的反応促進物質を存在(又は含有)させればよい。

なお、これらの場合、定量を第1段階と第2段階の2段階に分けて行うとき、前記の選択的反応促進物質は、第1段階に存在させてもよく、第2段階に存在させてもよく、又は第1段階及び第2段階に存在させてもよい。いずれの場合も、

同様の効果を得ることができる。

同様に、定量の試薬が第1試薬及び第2試薬よりなるとき、前記の選択的反応促進物質は、第1試薬に含有させてもよく、第2試薬に存在させてもよく、又は第1試薬及び第2試薬に含有させてもよい。いずれの場合も、同様の効果を得ることができる。

また、複数種類の選択的反応促進物質を組み合わせ、同時に存在（又は含有）させて使用することもできる。

例えば、表1のタイプ2の選択的反応促進物質とタイプ3の選択的反応促進物質を組み合わせ存在（又は含有）させることにより、タイプ10の選択的反応促進物質を存在（又は含有）させるのと、同様の効果を得ることができる。

そして、例えば、タイプ10の選択的反応促進物質と同様の効果を得るのに、タイプ10の選択的反応促進物質とともに、タイプ2の選択的反応促進物質及び／又はタイプ3の選択的反応促進物質を加えて存在（又は含有）させてもよい。

b) 本発明の第2の方法（又は第2の試薬）の場合

前記の本発明の第2の方法（又は第2の試薬）の場合、超低比重リポ蛋白及び中間比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライドを定量するには、第1段階（又は第1試薬）において、表1におけるタイプ21の選択的反応促進物質を存在（又は含有）させればよい。

また、超低比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライドを定量するには、第1段階（又は第1試薬）において、タイプ29の選択的反応促進物質を存在（又は含有）させればよい。

そして、中間比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライドを定量するには、第1段階（又は第1試薬）において、タイプ28の選択的反応促進物質を存在（又は含有）させればよい。

また、第2段階（又は第2試薬）において、第1段階（又は第1試薬）に存在（又は含有）させた選択的反応促進物質とともにこの選択的反応促進物質とは異なる選択的反応促進物質を存在（又は含有）させてもよいが、この場合の、選択的反応促進物質の組み合わせの一例を以下に記載する。

超低比重リポ蛋白及び中間比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライドを定量するのには、第1段階（又は第1試薬）においてタイプ21の選択的反応促進物質を存在（又は含有）させ、第2段階（又は第2試薬）においてタイプ10の選択的反応促進物質を存在（又は含有）させればよい。

この場合、第1段階（又は試料と第1試薬の混合後）においてはタイプ21の選択的反応促進物質の存在下、カイロミクロンに含まれているトリグリセライド、低比重リポ蛋白に含まれているトリグリセライド、及び高比重リポ蛋白に含まれているトリグリセライドが、トリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒する酵素と反応し、消去される。

ここで消去されずに残存する超低比重リポ蛋白に含まれているトリグリセライド、及び中間比重リポ蛋白に含まれているトリグリセライドを、第2段階（又は第2試薬の添加後）において、タイプ10の選択的反応促進物質の存在下、トリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒する酵素と反応させ、生成する過酸化水素又は還元型補酵素の測定を行う。

また、超低比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライドを定量するのには、第1段階（又は第1試薬）においてタイプ21の選択的反応促進物質を存在（又は含有）させ、第2段階（又は第2試薬）においてタイプ2の選択的反応促進物質を存在（又は含有）させればよい。あるいは、第1段階（又は第1試薬）においてタイプ29の選択的反応促進物質を存在させ、第2段階（又は第2試薬）においてタイプ2及び／又はタイプ10の選択的反応促進物質を存在（又は含有）させればよい。

そして、中間比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライドを定量するのには、第1段階（又は第1試薬）においてタイプ21の選択的反応促進物質を存在（又は含有）させ、第2段階（又は第2試薬）においてタイプ3の選択的反応促進物質を存在（又は含有）させればよい。あるいは、第1段階（又は第1試薬）においてタイプ28の選択的反応促進物質を存在（又は含有）させ、第2段階（又は第2試薬）においてタイプ3及び／又はタイプ10の選択的反応促進物質を存在（又は含有）させればよい。

また、複数種類の選択的反応促進物質を組み合わせ、同時に存在（又は含有）させて使用することもできる。

例えば、表 1 のタイプ 1 の選択的反応促進物質とタイプ 1 5 の選択的反応促進物質を組み合わせ、存在（又は含有）させることにより、タイプ 2 1 の選択的反応促進物質を存在（又は含有）させるのと、同様の効果を得ることができる。

そして、例えば、タイプ 2 8 の選択的反応促進物質と同様の効果を得るのに、タイプ 2 8 の選択的反応促進物質とともに、タイプ 1 の選択的反応促進物質及び／又はタイプ 1 5 の選択的反応促進物質等を加えて存在（又は含有）させてもよい。

c) 本発明の第 3 の方法（又は第 3 の試薬）の場合

前記の本発明の第 3 の方法（又は第 3 の試薬）の場合、超低比重リポ蛋白及び中間比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライドを定量するのには、第 1 段階に存在させる（第 1 試薬に含有させる）選択的反応促進物質と第 2 段階に存在させる（第 2 試薬に含有させる）選択的反応促進物質を、表 2 に示したタイプの組み合わせで存在（又は含有）させればよい。

すなわち、この表において、「○」で示された欄における、「第 1 段階に存在させる（第 1 試薬に含有させる）選択的反応促進物質のタイプ」と「第 2 段階に存在させる（第 2 試薬に含有させる）選択的反応促進物質のタイプ」の組み合わせで存在（又は含有）させればよい。

なお、この表において、1～31 までの選択的反応促進物質のタイプを示した欄に記載した文字は、そのタイプの選択的反応促進物質が反応を促進するトリグリセライドを含むリポ蛋白の種類を表す。すなわち、「V」は超低比重リポ蛋白（VLDL）を、「I」は中間比重リポ蛋白（IDL）を、「C」はカイロミクロンを、「L」は低比重リポ蛋白（LDL）を、そして「H」は高比重リポ蛋白（HDL）を表す（以下の表 3 及び表 4 においても同じ。）。

例えば、第1段階（又は第1試薬）においてタイプ9の選択的反応促進物質を存在（又は含有）させ、第2段階（又は第2試薬）においてタイプ27の選択的反応促進物質を存在（又は含有）させて定量を行う場合、第1段階（又は試料と第1試薬の混合後）においてはタイプ9の選択的反応促進物質の存在下、カイロミクロンに含まれているトリグリセライド、及び高比重リポ蛋白に含まれているトリグリセライドが、トリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒する酵素と反応し、消去される。

ここでは、超低比重リポ蛋白に含まれているトリグリセライド、中間比重リポ蛋白に含まれているトリグリセライド、及び低比重リポ蛋白に含まれているトリグリセライドが消去されずに残存する。

第2段階（又は第2試薬の添加後）において、タイプ27の選択的反応促進物質の存在下、超低比重リポ蛋白に含まれているトリグリセライド、及び中間比重リポ蛋白に含まれているトリグリセライドを、トリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒する酵素と反応させ、生成する過酸化水素又は還元型補酵素の測定を行う。

なお、この第2段階（第2試薬）において存在（又は含有）させるタイプ27の選択的反応促進物質は、超低比重リポ蛋白に含まれているトリグリセライド、及び中間比重リポ蛋白に含まれているトリグリセライドだけではなく、カイロミクロンに含まれているトリグリセライド、及び高比重リポ蛋白に含まれているトリグリセライドも前記酵素と反応させることができるものであるが、第1段階（又は試料と第1試薬の添加後）においてタイプ9の選択的反応促進物質の存在下、カイロミクロンに含まれているトリグリセライド、及び高比重リポ蛋白に含まれているトリグリセライドは既に消去され存在しないので、第2段階（又は第2試薬添加後）でタイプ27の選択的反応促進物質を存在させても、カイロミクロンに含まれているトリグリセライド、及び高比重リポ蛋白に含まれているトリグリセライドを測り込んでしまうことはなく、超低比重リポ蛋白に含まれているトリグリセライド、及び中間比重リポ蛋白に含まれているトリグリセライドだけを定量することができる。

超低比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライドを定量するには、第1段階に存在させる（第1試薬に含有させる）選択的反応促進物質と第2段階に存在させる（第2試薬に含有させる）選択的反応促進物質を、表3に示したタイプの組み合わせで存在（又は含有）させればよい。

すなわち、この表において、「○」で示された欄における、「第1段階に存在させる（第1試薬に含有させる）選択的反応促進物質のタイプ」と「第2段階に存在させる（第2試薬に含有させる）選択的反応促進物質のタイプ」の組み合わせで存在（又は含有）させればよい。

三
集

第1段階に存在させる（第1試薬に含有させる）選択的反応促進物質のタイプ																															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31
	(C)	(V)	(N)	(L)	(H)	(CV)	(GL)	(CH)	(ND)	(VL)	(NH)	(IL)	(IH)	(LL)	(LH)	(GV)	(GVL)	(GVH)	(CIL)	(CHI)	(CLH)	(NIL)	(NIH)	(VLH)	(ILL)	(CVL)	(GVH)	(GVLH)	(GILH)	(VLH)	(CVLH)
1																															
2																															
3																															
4																															
5																															
6																															
7																															
8																															
9																															
10																															
11																															
12																															
13																															
14																															
15																															
16																															
17																															
18																															
19																															
20																															
21																															
22																															
23																															
24																															
25																															
26																															
27																															
28																															
29																															
30																															
31																															

第2段階に存在させる（第2試薬に含有させる）選択的反応促進物質のタイプ																															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31
	(C)	(V)	(N)	(L)	(H)	(CV)	(GL)	(CH)	(ND)	(VL)	(NH)	(IL)	(IH)	(LL)	(LH)	(GV)	(GVL)	(GVH)	(CIL)	(CHI)	(CLH)	(NIL)	(NIH)	(VLH)	(ILL)	(CVL)	(GVH)	(GVLH)	(GILH)	(VLH)	(CVLH)
1																															
2																															
3																															
4																															
5																															
6																															
7																															
8																															
9																															
10																															
11																															
12																															
13																															
14																															
15																															
16																															
17																															
18																															
19																															
20																															
21																															
22																															
23																															
24																															
25																															
26																															
27																															
28																															
29																															
30																															
31																															

そして、中間比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライドを定量するには、第1段階に存在させる（第1試薬に含有させる）選択的反応促進物質と第2段階に存在させる（第2試薬に含有させる）選択的反応促進物質を、表4に示したタイプの組み合わせで存在（又は含有）させればよい。

すなわち、この表において、「○」で示された欄における、「第1段階に存在させる（第1試薬に含有させる）選択的反応促進物質のタイプ」と「第2段階に存在させる（第2試薬に含有させる）選択的反応促進物質のタイプ」の組み合わせで存在（又は含有）させればよい。

表 4

[illegible]

以上の本発明の第3の方法（又は第3の試薬）においても、複数種類の選択的反応促進物質を組み合わせ、同時に存在（又は含有）させて使用することもできる。

例えば、表1のタイプ4の選択的反応促進物質とタイプ5の選択的反応促進物質を組み合わせ存在（又は含有）させることにより、タイプ15の選択的反応促進物質を存在（又は含有）させるのと、同様の効果を得ることができる。

そして、例えば、タイプ28の選択的反応促進物質と同様の効果を得るのに、タイプ28の選択的反応促進物質とともに、タイプ1の選択的反応促進物質及び／又はタイプ15の選択的反応促進物質等を加えて存在（又は含有）させてもよい。

⑤ 選択的反応促進物質の具体例

本発明の方法（本発明の試薬）において、選択的反応促進物質の具体例として、界面活性剤、ポリオキシアルキレン若しくはその誘導体、又は多糖類若しくはその誘導体等を挙げることができる。

界面活性剤としては、非イオン性界面活性剤、陽イオン性界面活性剤、陰イオン性界面活性剤、又は両性界面活性剤を挙げることができる。

非イオン性界面活性剤としては、例えば、ポリオキシアルキレンポリオール類、ポリオキシエチレンアルキルエーテル類、ポリオキシエチレンアルキルフェニルホルムアルデヒド縮合物、ポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテル類、又は n -ヘプチル- β -D-チオグルコシド（ n -ヘプチル- β -D-チオグルコピラノシド、 n -Heptyl- β -D-thiogluco pyranoside）等を挙げることができる。

ポリオキシアルキレンポリオール等におけるポリオキシアルキレンの付加モル数は、5～1,000の範囲が好ましく、10～500の範囲が特に好ましい。

また、ポリオキシエチレンアルキルエーテル類、又はポリオキシエチレンアルキルフェニルホルムアルデヒド縮合物等におけるエチレンオキシドの付加モル数は、5～1,000の範囲が好ましく、5～500の範囲が特に好ましい。

そして、ポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテル類等におけるエチレン

オキサイドの付加モル数は、5～1,000の範囲が好ましく、5～500の範囲が特に好ましい。

両性界面活性剤としては、例えば、3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-2-hydroxypropane sulfonic acid (CHAPSO) 等を挙げることができる。

また、ポリオキシアルキレン若しくはその誘導体としては、例えば、ポリオキシエチレン（ポリエチレングリコール）若しくはその誘導体、又はポリオキシプロピレン（ポリプロピレングリコール）若しくはその誘導体等を挙げることができる。

このポリオキシアルキレンの付加モル数は、5～1,000の範囲が好ましく、10～500の範囲が特に好ましい。

多糖類若しくはその誘導体としては、例えば、シクロデキストリン若しくはその誘導体、デキストランサルフェイト若しくはその誘導体、デキストラン若しくはその誘導体、ヘパリン若しくはその誘導体等を挙げることができる。

シクロデキストリンとしては、 α -シクロデキストリン、 β -シクロデキストリン、又は γ -シクロデキストリンを挙げることができる。

また、シクロデキストリン誘導体としては、例えば、 α -シクロデキストリン、 β -シクロデキストリン、又は γ -シクロデキストリンの水酸基が、ヒドロキシプロピル基、マルトシル基、ヒドロキシブチル基、ジエチルアミノエチル基などで置換されたもの、又はこれらのシクロデキストリン若しくはその誘導体の架橋物等を挙げることができる。

デキストランサルフェイト若しくはその誘導体は、分子量が1,000～5,000,000の範囲のものが好ましく、分子量が5,000～1,000,000の範囲のものが特に好ましい。

これらの選択的反応促進物質のより詳細な具体例を、表5に示した。

表 5

濃度	選択の反応促進物質	販売元	化学構造
0.1%	TMH-7EX	日光ケミカルズ	POE(7)トリメチルヘキシルエーテル
0.1%	サンニックスFA-103	三洋化成工業	特殊ポリオール
0.1%	PEG2,000	和光純薬工業	ポリエチレングリコール2,000
0.1%	PEG6,000	和光純薬工業	ポリエチレングリコール6,000
0.1%	PEG10,000	日光ケミカルズ	ポリエチレングリコール10,000
0.1%	PEG20,000	和光純薬工業	ポリエチレングリコール20,000
0.1%	PEG1,540	和光純薬工業	ポリエチレングリコール1,500
0.1%	エマルゲン911	花王	ポリオキシエチレンアルキルエーテル
0.1%	KF-354	信越シリコン	ポリエーテル変性シリコンオイル
0.1%	KF-907	信越シリコン	ポリエーテル変性シリコンオイル
0.1%	サルコシネートCN-100	日光ケミカルズ	コイルサルコシンナトリウム
0.1%	NP-10	日光ケミカルズ	POE(10)ノニルフェニルエーテル
0.1%	BL-9EX	日光ケミカルズ	POE(9)ラウリルエーテル
0.1%	KF-351	信越シリコン	ポリエーテル変性シリコンオイル
0.1%	KF-700	信越シリコン	親水性特殊変性シリコンオイル
0.1%	R-1020	日光ケミカルズ	POEノニルフェニルホルムアルデヒド縮合物
0.1%	サンニックスGP400	三洋化成工業	ポリオキシプロピル化グリセリン
0.1%	ブルロニックP-85	旭電化工業	ポリオキシエチレン・ポリオキシプロピレン縮合物
0.1%	ブルロニックL-34	旭電化工業	ポリオキシエチレン・ポリオキシプロピレン縮合物
0.1%	ブルロニックL-44	旭電化工業	ポリオキシエチレン・ポリオキシプロピレン縮合物
0.1%	アデカトルSO-120	旭電化工業	高級アルコールエトキシレート
0.1%	アデカトルNP-720	旭電化工業	ポリオキシエチレンアルキルアリルエーテル
0.1%	PEG1,000	和光純薬工業	ポリエチレングリコール1,000
0.5%	OP-8	日光ケミカルズ	POE(8)オクチルフェニルエーテル
0.1%	BT-7	日光ケミカルズ	POE(7)2級アルキルエーテル
0.1%	BT-9EX	日光ケミカルズ	POE(9)2級アルキルエーテル
0.1%	Tween20	和光純薬工業	POE(20)ソルビタンモノラウレート
0.1%	OP-10	日光ケミカルズ	POE(10)オクチルフェニルエーテル
0.1%	POE-p-トルエンスルホアミド	日光ケミカルズ	POE-p-トルエンスルホアミド
0.1%	デキストラン硫酸 ~500,000	ファルマシア	デキストラン硫酸
0.1%	α -CD	和光純薬工業	α -シクロデキストリン
0.1%	ヒドロキシブチル- α -CD	横浜国際バイオ研究所	ヒドロキシブチル- α -シクロデキストリン
0.1%	マルトシル- β -CD		マルトシル- β -シクロデキストリン
0.1%	ヒドロキシブチル- β -CD		ヒドロキシブチル- β -シクロデキストリン
0.1%	ヒドロキシプロピル- β -CD		ヒドロキシプロピル- β -シクロデキストリン
0.1%	水溶性 β -シクロデキストリンポリマー		水溶性 β -シクロデキストリンポリマー (エピクロルヒドリン架橋)
0.1%	ジエチルアミノエチル- β -CD	横浜国際バイオ研究所	ジエチルアミノエチル- β -シクロデキストリン
0.1%	γ -CD		γ -シクロデキストリン
0.1%	ヒドロキシプロピル- α -CD		ヒドロキシプロピル- α -シクロデキストリン
0.1%	ヒドロキシプロピル- γ -CD		ヒドロキシプロピル- γ -シクロデキストリン

POE:ポリオキシエチレン

先に述べたように、選択的反応促進物質は、複数種類のものを組み合わせて、存在（又は含有）させてもよい。

選択的反応促進物質を存在（又は含有）させる濃度は、選択的反応促進物質の種類、トリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒する酵素の種類及び由来、試料中のリポ蛋白に含まれるトリグリセライドの濃度、又は第1試薬と第2試薬の混合比率等により異なるので、一概には言えず、適宜その条件に適した濃度で存在（又は含有）させればよいが、通常は、0.001～10%の濃度で存在（又は含有）させればよく、0.01～5%の濃度で存在（又は含有）させることが好ましい。

4. 反応補助物質

本発明の方法（本発明の試薬）には、選択的反応促進物質とともに反応補助物質を存在（又は含有）させてもよい。

この反応補助物質の存在（又は含有）により、選択的反応促進物質の選択的反応促進の働きを高めることができる。

反応補助物質の具体例として、ポリアニオン、ハロゲンイオン、金属イオン、又はレクチン等を挙げることができる。

ポリアニオンとしては、例えば、リンタングステン等を挙げることができる。

ハロゲンイオンとしては、例えば、クロールイオン等を挙げることができる。

金属イオンとしては、例えば、銅イオン、又はマンガンイオンなどの2価金属イオン等を挙げることができる。

レクチンとしては、例えば、レンズマメレクチン等を挙げることができる。

これらの反応補助物質は、複数種類のものを組み合わせて、存在（又は含有）させてもよい。

反応補助物質を存在（又は含有）させる濃度は、選択的反応促進物質の場合と同様に各種条件により異なるので、一概には言えず、適宜その条件に適した濃度で存在（又は含有）させればよい。

図面の簡単な説明

図1は、選択的反応促進物質としてn-ヘプチル-β-D-チオグルコシドを用いて、4種類のリボ蛋白画分に含まれるトリグリセライドの定量を行ったときの結果を示した図である。

図2は、選択的反応促進物質としてサンニックスFA-103を用いて、5種類のリボ蛋白画分に含まれるトリグリセライドの定量を行ったときの結果を示した図である。

図3は、選択的反応促進物質としてサンニックスFA-103を用いて、5種類のリボ蛋白画分に含まれるトリグリセライドの定量を行ったときの、日立7150形自動分析装置の反応タイムコースを示した図である。

図4は、総トリグリセライド定量試薬により、5種類のリボ蛋白画分に含まれるトリグリセライドの定量を行ったときの、日立7150形自動分析装置の反応タイムコースを示した図である。

本明細書は本願の優先権の基礎である特願平11-128994号及びPCT/JP99/06723号の明細書及び／又は図面に記載される内容を包含する。

発明を実施するための最良の形態

次に、実施例を挙げて本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

〔実施例1〕本発明の方法及び試薬による精製リボ蛋白画分中のトリグリセライドの定量-1

選択的反応促進物質として、n-ヘプチル-β-D-チオグルコシドを用いた本発明の方法及び試薬にて、精製リボ蛋白画分中のトリグリセライドの定量を行った。

第1試薬として、グリセロールキナーゼ1.0単位/ml、グリセロール-3-リン酸オキシダーゼ8.0単位/ml、カタラーゼ、アデノシン-3-リン酸4.1mmol/l、N-(3,5-ジメトキシフェニル)-N'-サクシニルエチレンジアミンナトリウム0.94mmol/l、n-ヘプチル-β-D-チ

オグルコシド 0.4%、グッド緩衝液 (pH 6.0) を合わせたものを用意した。

また第2試薬として、リポプロテインリパーゼ 2.0 単位/ml、ペルオキシダーゼ、4-アミノアンチピリン 2.5 mmol/l、グッド緩衝液を合わせたものを用意した。

実際の測定では、37℃にした試験管に血清 3 μ l と第1試薬 300 μ l を入れ5分反応させ、次に第2試薬 100 μ l を加えた。

その直後と5分後に波長 600 nm で反応液の吸光度を測定した。

この値を基に、予め作成しておいた検量線を用いて、トリグリセライド値を算出した。

一方、凝固阻止剤を入れた採血管で血液を採取し、密度勾配遠心法にてカイロミクロン、超低比重リポ蛋白及び中間比重リポ蛋白、低比重リポ蛋白、並びに高比重リポ蛋白の4種類のリポ蛋白を分離した。

この4つの試料に対して、本法による定量と市販の試薬キット (デタミナー L TG-I I ; 協和メデックス社製) による総トリグリセライドの定量を行い、両者の比を求めた。

この結果を図1に示す。

本発明によって、カイロミクロン、低比重リポ蛋白、及び高比重リポ蛋白中のトリグリセライドが選択的に反応分解できることが示されている。

〔実施例2〕本発明の方法及び試薬による精製リポ蛋白画分中のトリグリセライドの定量-2

各種の選択的反応促進物質を用い、本発明の方法及び試薬にて、精製リポ蛋白画分中のトリグリセライドの定量を行った。

1. 本発明の試薬の調製

(1) 第1試薬 (A) の調製

下記の試薬成分をそれぞれ記載の濃度になるように純水に溶解し、pH 6.0 (20℃) の試薬を調製した。

試薬成分	濃度
2-メルホリノエタンスルホン酸 [MES]	50 mmol/l

N- (2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル) - 3, 5-ジメトキシアニリンナトリウム [HDAOS] (色原体)	1. 5 mmol / l
グリセロールキナーゼ	150 単位 / l
グリセロール-3-リン酸オキシダーゼ	3, 000 単位 / l
アデノシン三リン酸ナトリウム	0. 5 mmol / l
塩化マグネシウム・六水和物	1 mmol / l
カタラーゼ	100, 000 単位 / l
反応促進物質 [物質名及び濃度は表 6 に記載]	

(2) 第2試薬 (B) の調製

下記の試薬成分をそれぞれ記載の濃度になるように純水に溶解し、pH 6. 0 (20℃) の試薬を調製した。

試薬成分	濃度
2-モルホリノエタンスルホン酸 [MES]	50 mmol / l
4-アミノアンチピリン	0. 75 mmol / l
ペルオキシダーゼ	600 単位 / l
リボプロテインリパーゼ	120, 000 単位 / l
アジ化ナトリウム	0. 1 %

反応促進物質 [物質名及び濃度は表 6 に記載]

2. 総トリグリセライド定量試薬 (対照) の調製

(1) 第1試薬 (C) の調製

下記の試薬成分をそれぞれ記載の濃度になるように純水に溶解し、pH 6. 0 (20℃) の試薬を調製した。

試薬成分	濃度
2-モルホリノエタンスルホン酸 [MES]	50 mmol / l
N- (2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル) - 3, 5-ジメトキシアニリンナトリウム [HDAOS] (色原体)	1. 5 mmol / l
グリセロールキナーゼ	150 単位 / l
グリセロール-3-リン酸オキシダーゼ	3, 000 単位 / l

アデノシン三リン酸ナトリウム	0.5 mmol/l
塩化マグネシウム・六水和物	1 mmol/l
カタラーゼ	100,000 単位/l
アデカノール B-795 (旭電化工業)	0.5% (w/v)

(2) 第2試薬 (D) の調製

下記の試薬成分をそれぞれ記載の濃度になるように純水に溶解し、pH 6.0 (20℃) の試薬を調製した。

試薬成分	濃度
2-メルホリノエタンスルホン酸 [MES]	50 mmol/l
4-アミノアンチピリン	0.75 mmol/l
ペルオキシダーゼ	600 単位/l
リボプロテインリパーゼ	120,000 単位/l
アジ化ナトリウム	0.1%
アデカノール B-795 (旭電化工業)	0.5% (w/v)

3. 精製リボ蛋白画分の調製

実施例1と同様に密度勾配遠心法を用いて、カイロミクロン、超低比重リボ蛋白、中間比重リボ蛋白、低比重リボ蛋白、及び高比重リボ蛋白の5種類の比重の異なるリボ蛋白の画分をそれぞれ得た。これらの5種類の画分を試料として定量に供した。

4. リボ蛋白画分中のトリグリセライドの定量

リボ蛋白画分中のトリグリセライドの測定は、以下に示す手順で日立7150形自動分析装置 (日立製作所) を用いて行った。

前記3で調製した各リボ蛋白画分の3 μ l に、前記1の(1)の本発明の第1試薬 (A) 250 μ l を添加し、37℃で5分間加温した。

本発明の第1試薬 (A) 添加5分後に、前記1の(2)の第2試薬 (B) 125 μ L を添加した。

この反応混液の37℃、5分後の吸光度を、主波長600 nm、副波長700 nmの二波長分析により測定した。

なお、吸光度は、試料として各リポ蛋白画分を用いて前記の方法で測定した吸光度から、試料として生理食塩水を用いて同様の方法で測定した吸光度を差し引いた値を、吸光度の測定値とした。

前記の方法と同様にし、前記2の(1)の総トリグリセライド定量試薬の第1試薬(C)、及び前記2の(2)の総トリグリセライド定量試薬の第2試薬(D)を用いて、前記3で調製した各リポ蛋白画分中のトリグリセライドの定量を行った。

本発明の試薬に含有させた各々の選択的反応促進物質の効果を確かめるため、本発明の試薬(A及びB)を用いたときの吸光度の測定値を、総トリグリセライド定量試薬(C及びD)を用いたときの吸光度の測定値で除した値を求めた。

この値を表6に示した。

表 6

濃度	選択的反応促進物質	試料(リポ蛋白百分)					タイプ
		CM	VLDL	IDL	LDL	HDL	
0.5%	炭トリクリセライド定量試験(対照)	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	—
0.1%	TMH-7EX	0.09	0.31	0.20	0.04	0.24	23
0.5%		0.98	1.04	1.17	1.22	1.14	31
0.1%	BT-7	1.02	1.02	1.09	1.20	1.10	31
0.1%	サンニックスFA-103	0.78	0.66	0.43	0.03	0.08	16
0.2%		0.17	0.99	0.54	0.26	0.13	10
0.4%		0.20	1.05	0.69	0.45	0.22	10
0.5%		0.27	1.00	0.56	0.12	0.24	10
0.6%		0.30	1.04	0.81	0.51	0.32	10
0.8%		0.53	1.05	0.90	0.62	0.40	26
1.0%		0.92	1.03	1.04	1.03	1.03	31
0.5%	PEG2,000	0.54	0.29	0.47	0.05	0.11	16
0.1%	PEG6,000	0.59	0.27	0.40	0.05	0.06	7
0.5%		0.76	0.27	0.44	0.04	0.07	7
0.1%	PEG10,000	0.76	0.27	0.46	0.07	0.08	7
0.5%		0.47	0.29	0.51	0.04	0.14	16
0.1%	PEG20,000	0.24	0.26	0.49	0.07	0.15	10
0.5%		0.80	0.27	0.45	0.04	0.06	7
0.1%	PEG1,540	0.81	0.30	0.44	0.09	0.08	7
0.5%		0.84	0.30	0.47	0.07	0.07	7
0.1%	エマルゲン911	0.05	0.18	0.28	0.71	1.01	15
0.5%		0.05	0.24	0.51	0.93	1.01	25
0.1%	サルコシネートCN-100	0.84	0.92	0.38	0.05	0.04	6
0.5%		0.82	0.96	0.30	0.01	0.04	6
0.1%	NP-10	0.18	1.00	1.03	1.11	1.08	30
0.5%		0.22	1.00	1.08	1.08	1.08	30
0.1%	BL-9EX	0.07	0.23	0.41	0.83	1.08	15
0.1%	KF-351	0.17	0.17	0.36	0.09	0.30	14
0.1%	KF-700	0.81	0.25	0.32	0.03	0.06	1
0.1%	R-1020	0.02	0.07	0.10	0.32	0.93	5
0.5%		0.02	0.08	0.15	0.37	1.03	5
0.1%	サンニックスGP400	0.06	0.26	0.26	0.12	0.30	23
0.5%		0.14	0.43	0.61	0.32	0.58	30
0.1%	ブルロニックP-85	0.01	0.02	0.00	0.03	0.35	5
0.1%	ブルロニックL-34	0.71	0.30	0.54	0.11	0.23	7
0.1%	ブルロニックL-44	0.52	0.22	0.36	0.07	0.17	7
0.5%		0.14	0.23	0.31	0.03	0.32	23
0.1%	アデカトルSO-120	0.79	1.05	1.05	1.22	1.15	31
0.1%	アデカトルNP-720	0.03	0.11	0.10	0.51	0.93	15
0.5%		0.03	0.13	0.13	0.64	0.96	15
0.1%	PEG1,000	0.82	0.24	0.52	0.00	0.00	7
0.5%	OP-8	1.01	1.08	1.07	1.17	1.08	31
0.1%	BT-9EX	0.99	1.07	1.10	1.14	1.06	31
0.5%		1.03	1.05	1.15	1.17	1.11	31
0.1%	Tween20	1.13	1.08	1.07	1.63	0.80	26
0.5%		0.97	1.02	1.03	1.09	0.83	31
0.1%	OP-10	0.08	0.59	0.78	1.11	1.04	30
0.5%		0.10	0.70	0.93	1.16	1.11	30
0.1%	POE-p-トルエンスルホアミド	0.76	0.21	0.38	0.05	0.11	7
0.5%		0.27	0.33	0.26	-0.03	0.11	16
0.1%	デキストラン硫酸 ~500,000	0.12	0.42	0.17	0.07	0.14	2
0.5%		0.14	0.86	0.19	0.10	0.14	2
0.1%	α -CD	0.33	0.50	0.38	0.08	0.06	16
0.5%		0.63	0.75	0.75	0.30	0.06	16
0.1%	ヒドロキシブチル- α -CD	0.35	0.55	0.40	0.09	0.06	16
0.5%		0.57	0.68	0.58	0.14	0.05	16
0.1%	マルトシル- β -CD	0.33	0.63	0.34	0.05	0.05	16
0.5%		0.40	0.52	0.34	0.07	0.05	16
0.1%	ヒドロキシブチル- β -CD	0.44	0.64	0.43	0.08	0.05	16
0.5%		0.73	0.72	0.61	0.21	0.04	16
0.1%	ヒドロキシプロピル- β -CD	0.36	0.71	0.41	0.10	0.06	16
0.5%		0.46	0.58	0.45	0.09	0.04	16
0.1%	水溶性 β -シクロデキストリンポリマー	0.44	0.56	0.46	0.10	0.05	16
0.1%	ジエチルアミノエチル- β -CD	0.29	0.66	0.37	0.08	0.06	10
0.5%		0.37	0.50	0.35	0.07	0.05	16
0.1%	γ -CD	0.32	0.97	0.34	0.06	0.05	2
0.5%		0.53	1.03	0.59	0.11	0.06	16
0.1%	ヒドロキシプロピル- α -CD	0.22	0.59	0.32	0.07	0.05	10
0.5%		0.35	0.52	0.37	0.07	0.04	16
0.1%	ヒドロキシプロピル- γ -CD	0.31	0.95	0.34	0.10	0.06	2
0.5%		0.46	1.02	0.48	0.08	0.06	2

CM:カイロミクロン
VLDL:超低比重リポ蛋白
IDL:中間比重リポ蛋白
LDL:低比重リポ蛋白
HDL:高比重リポ蛋白

表6の結果より、カイロミクロンに含まれるトリグリセライドだけを反応させる選択的反応促進物質(タイプ1)は、KF-700 0.1%であった。

超低比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライドだけを反応させる選択的反応促進物質(タイプ2)は、デキストラン硫酸~500,000 0.1及び0.5%、 γ -CD 0.1%、並びにヒドロキシプロピル- γ -CD 0.1及び0.5%であった。

高比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライドだけを反応させる選択的反応促進物質(タイプ5)は、R-1020 0.1及び0.5%、並びにブルロニックP-85 0.1%であった。

カイロミクロン及び超低比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライドを反応させる選択的反応促進物質(タイプ6)は、サルコシネートCN-100 0.1及び0.5%であった。

カイロミクロン及び中間比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライドを反応させる選択的反応促進物質(タイプ7)は、PEG1,000 0.1%、PEG1,540 0.1及び0.5%、PEG6,000 0.1及び0.5%、PEG10,000 0.1%、PEG20,000 0.5%、ブルロニックL-34 0.1%、ブルロニックL-44 0.1%、並びにPOE-p-トルエンスルホアミド 0.1%であった。

超低比重リポ蛋白及び中間比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライドを反応させる選択的反応促進物質(タイプ10)は、サンニックスFA-103 0.2、0.4、0.5及び0.6%、PEG20,000 0.1%、ジエチルアミノエチル- β -CD 0.1%、並びにヒドロキシプロピル- α -CD 0.1%であった。

中間比重リポ蛋白及び高比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライドを反応させる選択的反応促進物質(タイプ14)は、KF-351 0.1%であった。

低比重リポ蛋白及び高比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライドを反応させる選択的反応促進物質(タイプ15)は、エマルゲン911 0.1%、BL-9EX 0.1%、並びにアデカトールNP-720 0.1及び0.5%であっ

た。

カイロミクロン、超低比重リポ蛋白、及び中間比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライドを反応させる選択的反応促進物質（タイプ16）は、サンニックスFA-103 0.1%、PEG2,000 0.5%、PEG10,000 0.5%、POE-p-トルエンスルホアミド 0.5%、 α -CD、ヒドロキシブチル- α -CD、マルトシル- β -CD、ヒドロキシブチル- β -CD及びヒドロキシプロピル- β -CDの0.1及び0.5%、水溶性 β -シクロデキストリンポリマー 0.1%、ジエチルアミノエチル- β -CD、 γ -CD、並びにヒドロキシプロピル- α -CDの0.5%であった。

超低比重リポ蛋白、中間比重リポ蛋白、及び高比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライドを反応させる選択的反応促進物質（タイプ23）は、TMH-7EX 0.1%、サンニックスGP-400 0.1%、及びプルロニックL-44 0.5%であった。

中間比重リポ蛋白、低比重リポ蛋白、及び高比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライドを反応させる選択的反応促進物質（タイプ25）は、エマルゲン911 0.5%であった。

カイロミクロン、超低比重リポ蛋白、中間比重リポ蛋白、及び低比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライドを反応させる選択的反応促進物質（タイプ26）は、Tween20 0.1%、及びサンニックスFA-103 0.8%であった。

超低比重リポ蛋白、中間比重リポ蛋白、低比重リポ蛋白、及び高比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライドを反応させる選択的反応促進物質（タイプ30）は、NP-10 0.1及び0.5%、サンニックスGP-400 0.5%、並びにOP-10 0.1及び0.5%であった。

カイロミクロン、超低比重リポ蛋白、中間比重リポ蛋白、低比重リポ蛋白、及び高比重リポ蛋白の全てのリポ蛋白に含まれるトリグリセライドに反応する、選択的反応促進物質（タイプ31）は、TMH-7EX 0.5%、BT-7 0.1%、アデカトールSO-120 0.1%、OP-8 0.5%、BT-9EX 0.1及び0.5%、Tween20 0.5%、並びにサンニックスFA

- 103 1%であった。

これらの結果から、本発明の定量する方法及び定量する試薬において、選択的反応促進物質を単独若しくは組み合わせて存在又は含有させることによって、超低比重リボ蛋白及び／又は中間比重リボ蛋白に含まれるトリグリセライドを選択的に定量することができることが確かめられた。

すなわち、ここで検討して選択的反応促進物質としてのタイプが判明した各々の選択的反応促進物質を、先の「④ 各タイプ選択的反応促進物質の使用方法」（「発明の実施の形態」の「本発明の方法及び試薬に共通する事項」の「3. 選択的反応促進物質」）の記載に従って、存在又は含有させて定量を行うことにより、超低比重リボ蛋白及び／又は中間比重リボ蛋白に含まれるトリグリセライドを選択的に定量できるのである。

一例を挙げれば、超低比重リボ蛋白及び中間比重リボ蛋白に含まれるトリグリセライドを反応させる、タイプ10の選択的反応促進物質である、サンニックスFA-103 0.2、0.4、0.5若しくは0.6%、PEG20,000 0.1%、ジエチルアミノエチル-β-CD 0.1%、又はヒドロキシプロピル-α-CD 0.1%を存在又は含有させることにより、超低比重リボ蛋白及び中間比重リボ蛋白に含まれるトリグリセライドを選択的に定量できることが分かる。

〔実施例3〕本発明の方法及び試薬による精製リボ蛋白画分中のトリグセライドの定量-3

選択的反応促進物質として、サンニックスFA-103を用いた本発明の方法及び試薬にて、精製リボ蛋白画分中のトリグリセライドの定量を行った。

1. サンニックスFA-103含有第1試薬の調製

選択的反応促進物質として、サンニックスFA-103を用い、その含有濃度を、0.2、0.4、0.6、0.8、又は1.0% (w/v) としたこと以外は、前記実施例2の1の(1)の本発明の第1試薬(A)と同じ試薬成分及び濃度として調製を行い、5種類のサンニックスFA-103含有第1試薬を調製した。

2. サンニックスFA-103含有第2試薬の調製

選択的反応促進物質として、サンニックスFA-103を用い、その含有濃度を、0.2、0.4、0.6、0.8、又は1.0% (w/v) としたこと以外は、前記実施例2の1の(2)の本発明の第2試薬(B)と同じ試薬成分及び濃度として調製を行い、5種類のサンニックスFA-103含有第2試薬を調製した。

前記実施例2の3と同様の手法で調製した5種類のリポ蛋白画分を試料とし、各サンニックスFA-103含有第1試薬及び第2試薬を用いて、前記実施例2の4と同様に各リポ蛋白画分中のトリグリセライドの定量を行った。

また、この定量の方法と同様にし、前記実施例2の2の(1)の総トリグリセライド定量試薬の第1試薬(C)、及び前記実施例2の2の(2)の総トリグリセライド定量試薬の第2試薬(D)を用いて、各リポ蛋白画分中のトリグリセライドの定量を行った。

本発明のサンニックスFA-103含有試薬に含有させた各々の選択的反応促進物質の効果を確かめるため、サンニックスFA-103含有試薬を用いたときの吸光度の測定値を、総トリグリセライド定量試薬(C及びD)を用いたときの吸光度の測定値で除した値を求めた。

この値を表7及び図2に示した。

なお、この図において、縦軸はサンニックスFA-103含有試薬を用いたときの吸光度の測定値を、総トリグリセライド定量試薬を用いたときの吸光度の測定値で除した値を表し、横軸は本発明のサンニックスFA-103含有試薬に含有させたサンニックスFA-103の濃度[% (w/v)]を表す。

表 7

濃度%	選択的反応促進物質	試料(リポ蛋白画分)				
		CM	VLDL	IDL	LDL	HDL
	総トリグリセライド測定試薬(対照)	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
0.2	サンニックスFA-103	0.17	0.99	0.54	0.26	0.13
0.4		0.20	1.05	0.69	0.45	0.22
0.6		0.30	1.04	0.81	0.51	0.32
0.8		0.53	1.05	0.90	0.62	0.40
1		0.92	1.03	1.04	1.03	1.03

CM:カイロミクロン
VLDL:超低比重リポ蛋白
IDL:中間比重リポ蛋白
LDL:低比重リポ蛋白
HDL:高比重リポ蛋白

表7及び図2より、サンニックスFA-103の濃度が0.8% (w/v)までの濃度において、同物質の存在(含有)により、リポ蛋白のうち超低比重リポ蛋白及び/又は中間比重リポ蛋白を選択的に定量できることが分かる。

特に、0.2% (w/v)の濃度においては、選択性が顕著である。

以上の結果よりも、本発明の定量する方法及び定量する試薬は、超低比重リポ蛋白及び/又は中間比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライドを選択的に定量することができることが確かめられた。

なお、本実施例において、本発明のサンニックスFA-103含有試薬〔サンニックスFA-103含有濃度が0.4% (w/v)のもの〕を用いて各リポ蛋白画分を定量した時の、日立7150形自動分析装置の反応タイムコースを図3に示した。

また、前記実施例2において、総トリグリセライド定量試薬(C及びD)を用いて各リポ蛋白画分を定量した時の、日立7150形自動分析装置の反応タイムコースを図4に示した。

これらの図において、縦軸は吸光度(主波長600nm、副波長700nm)を示す。また、横軸は同分析装置の測光ポイントを示し、反応時間約10分間を50ポイントで測定を行っているものである。

図4には、総トリグリセライド定量試薬には、リポ蛋白中のトリグリセライド

に対する選択性はなく、全てのリポ蛋白に含まれるトリグリセライドを定量していることが示されている。

それに対して図 3 では、リポ蛋白のうち超低比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライドが選択的に反応しており、サンニックス F A - 1 0 3 が超低比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライドを選択的に反応させ、定量することができる選択的反応促進物質であることが示されている。

これらの図からも、選択的反応促進物質を存在させる又は含有する本発明の定量する方法及び定量する試薬は、超低比重リポ蛋白及び／又は中間比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライドを選択的に定量できることが分かる。

本明細書中で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

産業上の利用の可能性

本発明の、超低比重リポ蛋白及び／又は中間比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライドを選択的に定量する方法及び試薬は、遠心や沈殿などの煩雑な前処置が必要なく、臨床検査用自動分析装置に適用可能であり、動脈硬化症の予防と治療に有用なデータを、簡便かつ正確に得ることができる。

請 求 の 範 囲

1. 被検試料に、選択的反応促進物質の存在下、トリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒する酵素を作用させ、生成する過酸化水素又は還元型補酵素の測定を行う、超低比重リポ蛋白及び／又は中間比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライドを選択的に定量する方法。
2. 選択的反応促進物質が、超低比重リポ蛋白及び／又は中間比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライドを選択的に定量するためのものである請求の範囲第1項記載の方法。
3. 選択的反応促進物質の存在下、超低比重リポ蛋白及び／又は中間比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライドを選択的に、トリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒する酵素と反応させることにより、超低比重リポ蛋白及び／又は中間比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライドの定量を選択的に行う請求の範囲第1項記載の方法。
4. 選択的反応促進物質が、超低比重リポ蛋白及び／又は中間比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライドを選択的に、トリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒する酵素と反応させるものである請求の範囲第3項記載の方法。
5. 第1段階として、選択的反応促進物質の存在下、超低比重リポ蛋白及び／又は中間比重リポ蛋白以外のリポ蛋白に含まれるトリグリセライドを選択的に、トリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒する酵素と反応させることにより、超低比重リポ蛋白及び／又は中間比重リポ蛋白以外のリポ蛋白に含まれるトリグリセライドを消去し、
第2段階として、残存するトリグリセライドを、トリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒する酵素と反応させることにより、超低比重リポ蛋白及び／又は中間比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライドの定量を選択的に行う請求の範囲第1項記載の方法。
6. 第1段階において存在させる選択的反応促進物質が、超低比重リポ蛋白及び

／又は中間比重リボ蛋白以外のリボ蛋白に含まれるトリグリセライドを選択的に、トリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒する酵素と反応させるものである請求の範囲第5項記載の方法。

7. 第2段階において、第1段階に存在させた選択的反応促進物質とともにこの選択的反応促進物質とは異なる選択的反応促進物質を存在させる請求の範囲第5項記載の方法。

8. 第1段階に存在させた選択的反応促進物質とは異なる選択的反応促進物質が、超低比重リボ蛋白及び／又は中間比重リボ蛋白に含まれるトリグリセライドを選択的に、トリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒する酵素と反応させるものである請求の範囲第7項記載の方法。

9. 第1段階として、選択的反応促進物質の存在下、超低比重リボ蛋白、中間比重リボ蛋白、カイロミクロン、低比重リボ蛋白及び高比重リボ蛋白からなる群から選ばれる少なくとも1種のリボ蛋白に含まれるトリグリセライドを選択的に、トリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒する酵素と反応させることにより、超低比重リボ蛋白、中間比重リボ蛋白、カイロミクロン、低比重リボ蛋白及び高比重リボ蛋白からなる群から選ばれるリボ蛋白に含まれる前記トリグリセライドを消去し（但し、超低比重リボ蛋白に含まれるトリグリセライド及び中間比重リボ蛋白に含まれるトリグリセライドの両方の消去は行わない）。

第2段階として、選択的反応促進物質の存在下、残存するトリグリセライドのうち超低比重リボ蛋白及び／又は中間比重リボ蛋白に含まれるトリグリセライドを選択的に、トリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒する酵素と反応させることにより、超低比重リボ蛋白及び／又は中間比重リボ蛋白に含まれるトリグリセライドの定量を選択的に行う請求の範囲1記載の方法。

10. 第1段階において存在させる選択的反応促進物質と、第2段階において存在させる選択的反応促進物質が、下記の組み合わせ (i) ~ (iii) :

(i)

第1段階：

カイロミクロン、低比重リポ蛋白及び高比重リポ蛋白からなる群から選ばれる少なくとも1種のリポ蛋白に含まれるトリグリセライドを選択的に、トリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒する酵素と反応させることにより、カイロミクロン、低比重リポ蛋白及び高比重リポ蛋白からなる群から選ばれるリポ蛋白に含まれる前記トリグリセライドを消去することができる選択的反応促進物質、

第2段階：

第1段階において、トリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒する酵素と選択的に反応したカイロミクロン、低比重リポ蛋白及び／又は高比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライド、並びに超低比重リポ蛋白及び／又は中間比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライドを、前記のトリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒する酵素と反応させることができる選択的反応促進物質；

(ii)

第1段階：

カイロミクロン、低比重リポ蛋白及び高比重リポ蛋白からなる群から選ばれる少なくとも1種のリポ蛋白に含まれるトリグリセライド、並びに中間比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライドを選択的に、トリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒する酵素と反応させることにより、カイロミクロン、低比重リポ蛋白及び高比重リポ蛋白からなる群から選ばれるリポ蛋白に含まれる前記トリグリセライド、並びに中間比重リポ蛋白に含まれる前記トリグリセライドを消去することができる選択的反応促進物質、

第2段階：

第1段階において、トリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒する酵素と選択的に反応したカイロミクロン、低比重リポ蛋白及び／又は高比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライド、並びに超低比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライド、更に場合によっては中間比重リポ蛋白に

含まれるトリグリセライドを、前記のトリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒する酵素と反応させることができる選択的反応促進物質；

(iii)

第1段階：

カイロミクロン、低比重リポ蛋白及び高比重リポ蛋白からなる群から選ばれる少なくとも1種のリポ蛋白に含まれるトリグリセライド、並びに超低比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライドを選択的に、トリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒する酵素と反応させることにより、カイロミクロン、低比重リポ蛋白及び高比重リポ蛋白からなる群から選ばれるリポ蛋白に含まれる前記トリグリセライド、並びに超低比重リポ蛋白に含まれる前記トリグリセライドを消去することができる選択的反応促進物質、

第2段階：

第1段階において、トリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒する酵素と選択的に反応したカイロミクロン、低比重リポ蛋白及び／又は高比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライド、並びに中間比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライド、更に場合によっては超低比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライドを、前記のトリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒する酵素と反応させることができる選択的反応促進物質；

のいずれかである請求の範囲第9項記載の方法。

11. トリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒する酵素が、(i) リポプロテインリパーゼ、(ii) グリセロールキナーゼ、並びに(iii) グリセロール-3-リン酸オキシダーゼ及びグリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼのいずれか一方である請求の範囲第1項記載の方法。

12. 被検試料が、超低比重リポ蛋白、中間比重リポ蛋白、カイロミクロン、低比重リポ蛋白及び高比重リポ蛋白からなる群から選ばれる少なくとも1種を含む可能性のあるものである請求の範囲第1項記載の方法。

13. 選択的反応促進物質が、界面活性剤、ポリオキシアルキレン若しくはその誘導体、又は多糖類若しくはその誘導体である請求の範囲第1項記載の方法。
14. 選択的反応促進物質とともに反応補助物質を存在させる請求の範囲第1項記載の方法。
15. 反応補助物質が、ポリアニオン、ハロゲンイオン、金属イオン又はレクチンである請求の範囲第14項記載の方法。
16. (i) 選択的反応促進物質、及び(ii) トリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒する酵素を含有する、試料中の超低比重リポ蛋白及び／又は中間比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライドを選択的に定量するための試薬。
17. 選択的反応促進物質が、超低比重リポ蛋白及び／又は中間比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライドを選択的に定量するためのものである請求の範囲第16項記載の試薬。
18. 選択的反応促進物質が、超低比重リポ蛋白及び／又は中間比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライドを選択的に、トリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒する酵素と反応させるものである請求の範囲第16項記載の試薬。
19. 選択的反応促進物質が、超低比重リポ蛋白及び／又は中間比重リポ蛋白以外のリポ蛋白に含まれるトリグリセライドを選択的に、トリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒する酵素と反応させ、これにより、超低比重リポ蛋白及び／又は中間比重リポ蛋白以外のリポ蛋白に含まれるトリグリセライドを消去するものである請求の範囲第16項記載の試薬。
20. 試薬が第1試薬及び第2試薬よりなり、選択的反応促進物質が第1試薬に含有されるものである請求の範囲第16項記載の試薬。
21. 試薬が第1試薬及び第2試薬よりなり、選択的反応促進物質が第2試薬に含有されるものである請求の範囲第16項記載の試薬。
22. 試薬が第1試薬及び第2試薬よりなり、選択的反応促進物質が第1試薬及び第2試薬に含有されるものである請求の範囲第16項記載の試薬。

23. 第2試薬に含有される選択的反応促進物質が、第1試薬に含有される選択的反応促進物質と同じ又は異なる選択的反応促進物質である請求の範囲第22項記載の試薬。

24. 試薬が第1試薬及び第2試薬よりなり、第1試薬に含有される選択的反応促進物質が、超低比重リポ蛋白及び／又は中間比重リポ蛋白以外のリポ蛋白に含まれるトリグリセライドを選択的に、トリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒する酵素と反応させ、これにより、超低比重リポ蛋白及び／又は中間比重リポ蛋白以外のリポ蛋白に含まれるトリグリセライドを消去するものであって、

第2試薬に含有される選択的反応促進物質が、超低比重リポ蛋白及び／又は中間比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライドを選択的に、トリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒する酵素と反応させるものである請求の範囲第16項記載の試薬。

25. 試薬が第1試薬及び第2試薬よりなり、第1試薬に含有される選択的反応促進物質が、超低比重リポ蛋白、中間比重リポ蛋白、カイロミクロン、低比重リポ蛋白及び高比重リポ蛋白からなる群から選ばれる少なくとも1種のリポ蛋白に含まれるトリグリセライドを選択的に、トリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒する酵素と反応させ、これにより、超低比重リポ蛋白、中間比重リポ蛋白、カイロミクロン、低比重リポ蛋白及び高比重リポ蛋白からなる群から選ばれるリポ蛋白に含まれる前記トリグリセライドを消去するものであり（但し、超低比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライド及び中間比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライドの両方の消去は行わない）。

第2試薬に含有される選択的反応促進物質が、残存するトリグリセライドのうち超低比重リポ蛋白及び／又は中間比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライドを選択的に、トリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒する酵素と反応させるものである請求の範囲第16項記載の試薬。

26. 第1試薬において含有させる選択的反応促進物質と、第2試薬において含有させる選択的反応促進物質が、下記の組み合わせ (i) ~ (iii) :

(i)

第1試薬：

カイロミクロン、低比重リポ蛋白及び高比重リポ蛋白からなる群から選ばれる少なくとも1種のリポ蛋白に含まれるトリグリセライドを選択的に、トリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒する酵素と反応させることにより、カイロミクロン、低比重リポ蛋白及び高比重リポ蛋白からなる群から選ばれるリポ蛋白に含まれる前記トリグリセライドを消去することができる選択的反応促進物質、

第2試薬：

第1試薬において、トリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒する酵素と選択的に反応したカイロミクロン、低比重リポ蛋白及び／又は高比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライド、並びに超低比重リポ蛋白及び／又は中間比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライドを、前記のトリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒する酵素と反応させることができる選択的反応促進物質；

(ii)

第1試薬：

カイロミクロン、低比重リポ蛋白及び高比重リポ蛋白からなる群から選ばれる少なくとも1種のリポ蛋白に含まれるトリグリセライド、並びに中間比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライドを選択的に、トリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒する酵素と反応させることにより、カイロミクロン、低比重リポ蛋白及び高比重リポ蛋白からなる群から選ばれるリポ蛋白に含まれる前記トリグリセライド、並びに中間比重リポ蛋白に含まれる前記トリグリセライドを消去することができる選択的反応促進物質、

第2試薬：

第1試薬において、トリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒する酵素と選択的に反応したカイロミクロン、低比重リポ蛋白及び／又は高比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライド、並びに超低比重

リポ蛋白に含まれるトリグリセライド、更に場合によっては中間比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライドを、前記のトリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒する酵素と反応させることができる選択的反応促進物質；

(iii)

第1試薬：

カイロミクロン、低比重リポ蛋白及び高比重リポ蛋白からなる群から選ばれる少なくとも1種のリポ蛋白に含まれるトリグリセライド、並びに超低比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライドを選択的に、トリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒する酵素と反応させることにより、カイロミクロン、低比重リポ蛋白及び高比重リポ蛋白からなる群から選ばれるリポ蛋白に含まれる前記トリグリセライド、並びに超低比重リポ蛋白に含まれる前記トリグリセライドを消去することができる選択的反応促進物質、

第2試薬：

第1試薬において、トリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒する酵素と選択的に反応したカイロミクロン、低比重リポ蛋白及び／又は高比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライド、並びに中間比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライド、更に場合によっては超低比重リポ蛋白に含まれるトリグリセライドを、前記のトリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒する酵素と反応させることができる選択的反応促進物質；

のいずれかである請求の範囲第25項記載の試薬。

27. トリグリセライドより過酸化水素又は還元型補酵素を生成させる一連の反応を触媒する酵素が、(i) リポプロテインリパーゼ、(ii) グリセロールキナーゼ、並びに(iii) グリセロール-3-リン酸オキシダーゼ及びグリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼのいずれか一方である請求の範囲第16項記載の試薬。

28. 被検試料が、超低比重リポ蛋白、中間比重リポ蛋白、カイロミクロン、低比重リポ蛋白及び高比重リポ蛋白からなる群から選ばれる少なくとも1種を含む

可能性のあるものである請求の範囲第16項記載の試薬。

29. 選択的反応促進物質が、界面活性剤、ポリオキシアルキレン若しくはその誘導体、又は多糖類若しくはその誘導体である請求の範囲第16項記載の試薬。

30. 選択的反応促進物質とともに反応補助物質を存在させる請求の範囲第16項記載の試薬。

31. 反応補助物質が、ポリアニオン、ハロゲンイオン、金属イオン又はレクチンである請求の範囲第30項記載の試薬。

32. リポプロテインリパーゼ、グリセロールキナーゼ、グリセロール-3-リン酸オキシダーゼ（又はグリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼ）などを組み合わせて血清中のトリグリセライドを定量する酵素比色法において、陽イオン性、陰イオン性、又は非イオン性の界面活性剤を作用させることにより、超低比重リポ蛋白（中間比重リポ蛋白も性状が類似しているためこれに含める）中のトリグリセライドを選択的に定量する方法。

33. リポプロテインリパーゼ、グリセロールキナーゼ、グリセロール-3-リン酸オキシダーゼ（又はグリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼ）などを組み合わせて血清中のトリグリセライドを定量する酵素的測定法において、陽イオン性、陰イオン性、又は非イオン性の界面活性剤を作用させることにより、カイロミクロン、低比重リポ蛋白、及び高比重リポ蛋白中のトリグリセライドを選択的に反応分解させ、その後、超低比重リポ蛋白（中間比重リポ蛋白も性状が類似しているためこれに含める）中のトリグリセライドを定量する方法。

34. 請求の範囲第32項記載の超低比重リポ蛋白中トリグリセライド定量方法において、同リポ蛋白と界面活性剤との選択性を促進するポリアニオン、2価金属イオン、又は糖を添加する方法。

35. 請求の範囲第33項記載の超低比重リポ蛋白中トリグリセライド定量方法において、カイロミクロン、LDL及びHDLと界面活性剤との選択性を促進するポリアニオン、2価金属イオン、又は糖を添加する方法。

FIG. 1

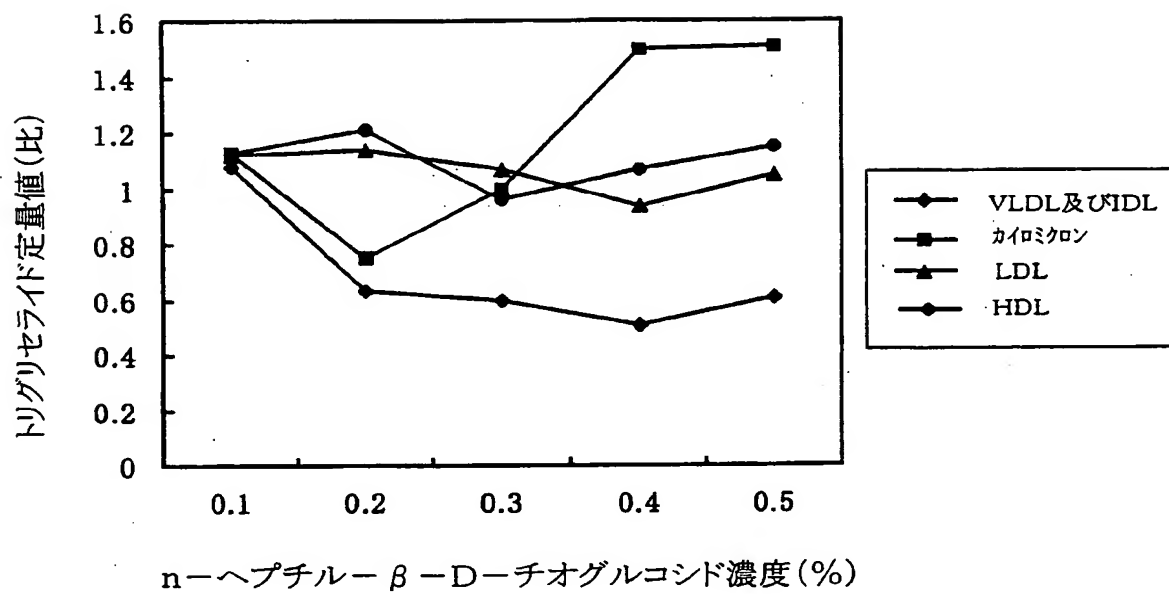
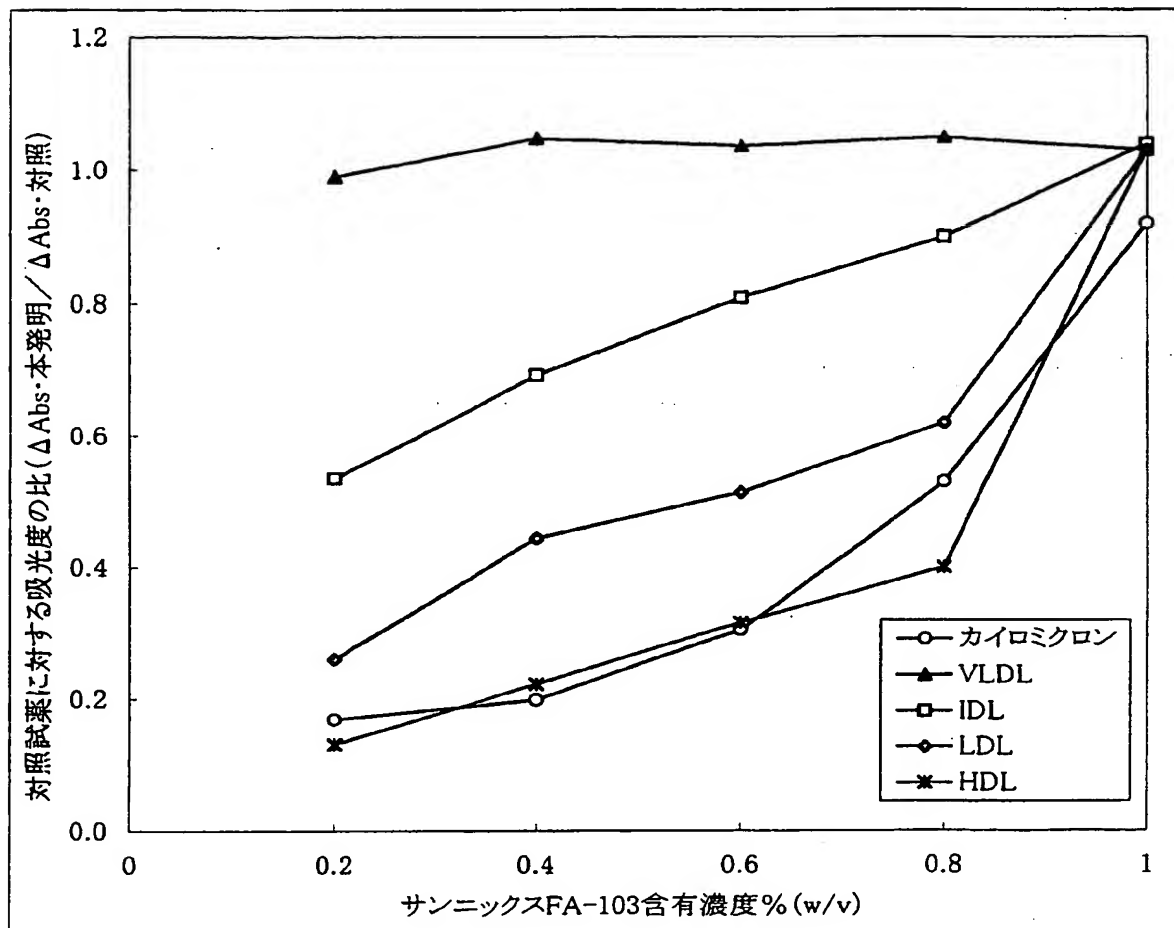
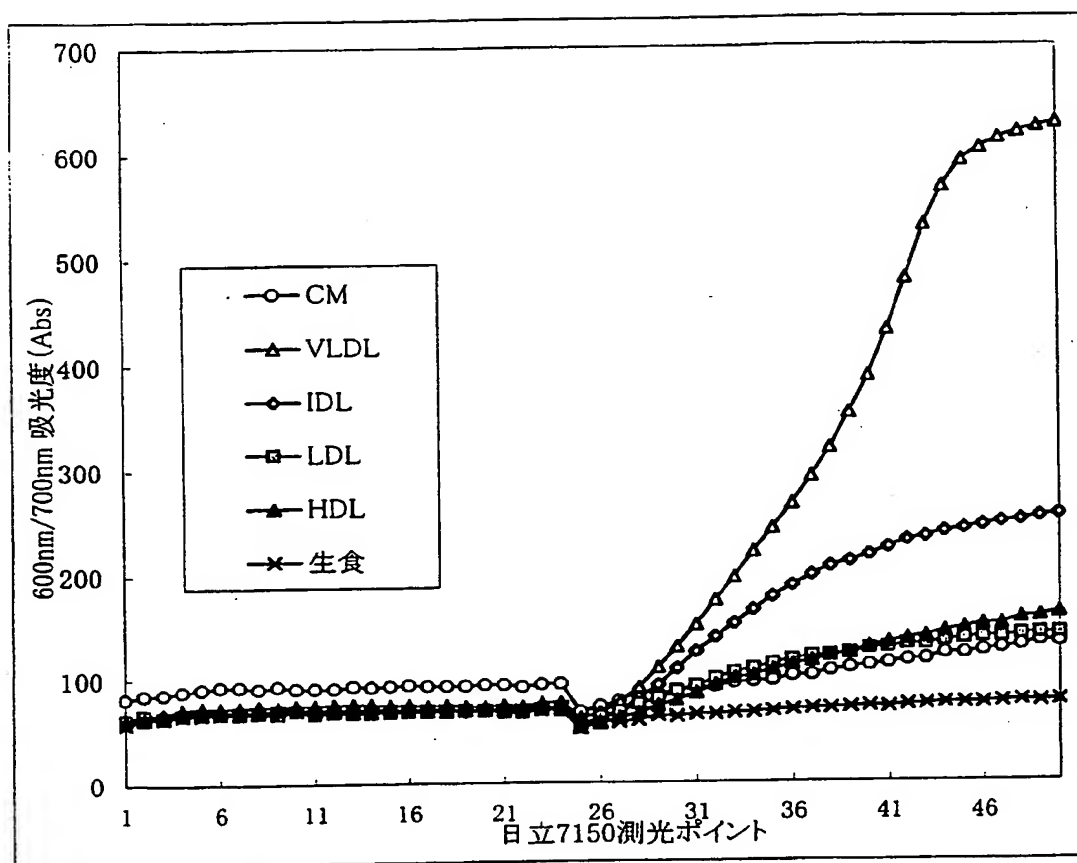


FIG. 2



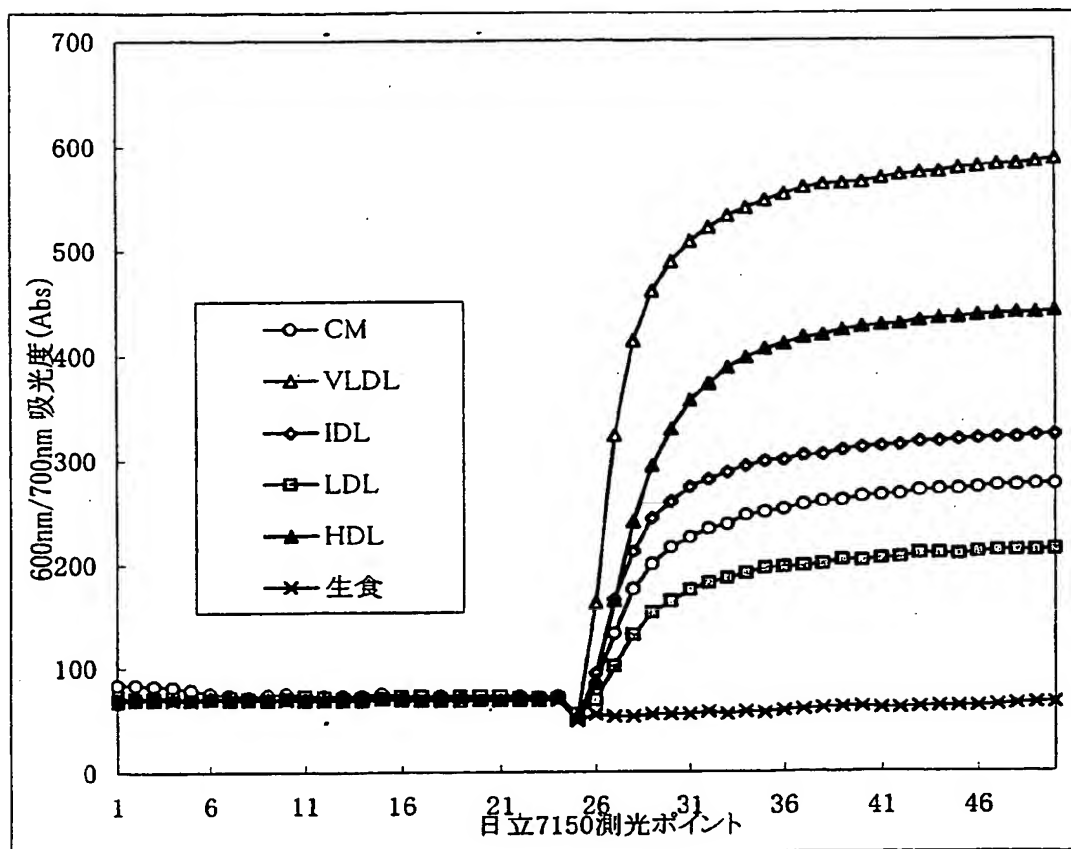
CM: カイロミクロン
VLDL: 超低比重リポ蛋白
IDL: 中間比重リポ蛋白
LDL: 低比重リポ蛋白
HDL: 高比重リポ蛋白

FIG. 3



CM:カイロミクロン
VLDL:超低比重リポ蛋白
IDL:中間比重リポ蛋白
LDL:低比重リポ蛋白
HDL:高比重リポ蛋白

F I G . 4



CM:カイロミクロン
VLDL:超低比重リポ蛋白
IDL:中間比重リポ蛋白
LDL:低比重リポ蛋白
HDL:高比重リポ蛋白

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/02114

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ C12Q1/61, C12Q1/60, C12Q1/48, C12Q1/44, C12Q1/32, C12Q1/26,
G01N33/92

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁷ C12Q1/26~1/61, G01N33/92

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
BIOSIS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO, 98/47005, A1 (DENKA SEIKEN KK), 22 October, 1998 (22.10.98) & EP, 990904, A1 & JP, 10-38888, A & AU, 9883114, A	1-35
EX	JP, 2000-116400, A (Yugen Kaisha TTK Kenkyusho), 25 April, 2000 (25.04.00) (Family: none)	1-35
A	EP, 88420, A1 (BOEHRINGER MANN GMBH), 14 September, 1983 (14.09.83) & DE, 3366371, G & US, 4544630, A & JP, 58-165800, A	1-35

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not
considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing
date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is
cited to establish the publication date of another citation or other
special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other
means
"P" document published prior to the international filing date but later
than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or
priority date and not in conflict with the application but cited to
understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
considered novel or cannot be considered to involve an inventive
step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
considered to involve an inventive step when the document is
combined with one or more other such documents, such
combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
28 June, 2000 (28.06.00)

Date of mailing of the international search report
18 July, 2000 (18.07.00)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl¹ C12Q1/61, C12Q1/60, C12Q1/48, C12Q1/44, C12Q1/32, C12Q1/26, G01N33/92

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl¹ C12Q1/26~1/61, G01N33/92

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
BIOSIS (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	WO, 98/47005, A1 (DENKA SEIKEN KK) 22日. 10月. 1998. (22. 10. 98) & EP, 990904, A1 & JP, 10-38888, A&AU, 9883114, A	1-35
EX	JP, 2000-116400, A (有限会社テイ・テイ・ケイ研究所) 25日. 4月. 2000. (25. 04. 00) (ファミリーなし)	1-35
A	EP, 88420, A1 (BOEHRINGER MANN GMBH) 14日. 9月. 1983 (14. 09. 83) & DE, 3366371, G&US, 4544630, A&JP, 58-165800, A	1-35

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

28. 06. 00

国際調査報告の発送日

18.07.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

鈴木 恵理子

4N 8114

印

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.